

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2004-008027

(43)Date of publication of application : 15.01.2004

(51)Int.Cl.

C12N 15/09
A61K 38/00
A61P 3/04
A61P 7/10
A61P 9/10
A61P 9/12
A61P 19/10
A61P 25/04
A61P 35/00
A61P 43/00
C07K 14/47

(21)Application number : 2002-162797

(71)Applicant : JAPAN SCIENCE & TECHNOLOGY
CORP
NATIONAL CARDIOVASCULAR
CENTER

(22)Date of filing : 04.06.2002

(72)Inventor : MINAMINO NAOTO
KATABUCHI TAKESHI

(54) NEW PEPTIDE HAVING CAMP-PRODUCING ACTIVITY

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a new protein which is expressed in a central nervous system and acts on a calcitonin receptor, to provide a gene therefor, and to provide a medicinal composition containing the same.

SOLUTION: This peptide has the following properties (1) to (6). (1) The peptide is expressed in a central nervous system. (2) The peptide strongly acts on a calcitonin receptor. (3) The peptide stimulates the cAMP-producing ability of a cell. (4) The peptide has an action for taking sodium ion in concentration dependency. (5) The peptide depresses the intake of calcium ion. (6) The peptide has a cell proliferation-inhibiting action. More concretely, the peptide has a specific amino acid sequence originated from swine brain or an amino acid sequence obtained by subjecting a part of the amino acid sequence to a deleting, substituting or adding treatment. In addition, a gene encoding the peptide, and a medicinal composition containing the same.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 13.07.2004

[Date of sending the examiner's decision of
rejection]

[Kind of final disposal of application other than
the examiner's decision of rejection or
application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision]

of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開2004-8027

(P2004-8027A)

(43)公開日 平成16年1月15日(2004.1.15)

(51) Int.Cl.⁷
C 12 N 15/09
A 61 K 38/00
A 61 P 3/04
A 61 P 7/10
A 61 P 9/10

F 1
C 12 N 15/00
A 61 P 3/04
A 61 P 7/10
A 61 P 9/10
A 61 P 9/12

テーマコード(参考)

4 B 0 2 4
4 C 0 8 4
4 H 0 4 5

審査請求 未請求 請求項の数 9 O L (全 62 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2002-162797(P2002-162797)
 (22)出願日 平成14年6月4日(2002.6.4)

(71)出願人 396020800
 科学技術振興事業団
 埼玉県川口市本町4丁目1番8号
 (71)出願人 591108880
 国立循環器病センター総長
 大阪府吹田市藤白台5丁目7番1号
 (74)代理人 100102668
 弁理士 佐伯 慶生
 (72)発明者 南野 直人
 大阪府寝屋川市大字高宮652-335
 (72)発明者 片渕 剛
 大阪府茨木市豊川4-26-8-304
 Fターム(参考) 4B024 AA01 BA80 CA04 HA01 HA12

最終頁に続く

(54)【発明の名称】cAMPの産生活性を有する新規ペプチド

(57)【要約】 (修正有)

【課題】中枢神経系に発現し、カルシトニン受容体に作用する新規かつ有用な蛋白質、その遺伝子、及びそれを含有してなる医薬組成物を提供する。

【解決手段】次の(1)～(6)の性質、(1)中枢神経系において発現し、(2)カルシトニン受容体に強く作用し、(3)細胞のcAMP産生能を促進させ、(4)ナトリウムイオンを濃度依存的に取り込む作用を有し、(5)カルシウムイオンの取り込みを抑制し、(6)細胞増殖を抑制する作用を有するペプチドに関する。より具体的には、ブタ脳由来の特定なアミノ酸配列、又はこれらのアミノ酸配列の一部が欠失、置換若しくは付加を受けたアミノ酸配列を有する前記のペプチドに関する。また、本発明は、これらのペプチドをコードする遺伝子、及びそれを含有してなる医薬組成物に関する。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

次の(1)～(6)の性質、

(1) 中枢神経系において発現し、(2) カルシトニン受容体に強く作用し、(3) 細胞のcAMP産生能を促進させ、(4) ナトリウムイオンを濃度依存的に取り込む作用を有し、(5) カルシウムイオンの取り込みを抑制し、(6) 細胞増殖を抑制する作用を有するペプチド。

【請求項 2】

少なくとも次ぎのアミノ酸配列、

Ser-Cys-Asn-Thr-Ala-Thr-Cys-Met-Thr-His- 10
10

Arg-Leu-Val-Gly-Leu-Leu-Ser-Arg-Ser-Gly- 20
20

Ser-Met-Val-Arg-Ser-Asn-Leu-Leu-Pro-Thr- 30
30

Lys-Met-Gly-Phe-Lys-Val-Phe-Gly-NH₂ 38

又はこれらのアミノ酸配列の一部が欠失、置換若しくは付加を受けたアミノ酸配列を有する請求項1に記載のペプチド。

20

【請求項 3】

ペプチドが少なくとも配列表の配列番号1、配列番号2、配列番号6、配列番号9、配列番号12、配列番号16、若しくは配列番号19で示されるアミノ酸配列、又はこれらのアミノ酸配列の一部が欠失、置換若しくは付加を受けたアミノ酸配列を有する請求項1又は2に記載のペプチド。

【請求項 4】

哺乳動物由来のペプチドである請求項1～3のいずれかに記載のペプチド。

【請求項 5】

請求項1～4のいずれかに記載のペプチドをコードする遺伝子。

【請求項 6】

遺伝子が、配列表の配列番号3、配列番号7、配列番号10、配列番号13、配列番号17、又は配列番号20で示される塩基配列を有するものである請求項5に記載の遺伝子。

30

【請求項 7】

請求項1～4のいずれかに記載のペプチド、及び製薬上許容される担体とからなる医薬組成物。

【請求項 8】

医薬組成物が、骨粗鬆症の予防・治療剤、癌の予防・治療剤、利尿剤、食欲抑制剤、又は鎮痛剤である請求項7に記載の医薬組成物。

40

【請求項 9】

医薬組成物が、降圧剤、又はPTCA(経皮的冠動脈形成術)後の再狭窄を防ぐための薬剤である請求項7に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、新規かつ有用なペプチド、それをコードする遺伝子、及びそれを含有してなる医薬組成物に関する。より詳細には、本発明は、次の(1)～(10)の性質、(1) 中枢神経系において発現し、(2) カルシトニン受容体に強く作用し、(3) 細胞のcAMP産生能を促進させ、(4) ナトリウムイオンを濃度依存的に取り込む作用を有し、(5) カルシウムイオンの取り込みを抑制し、(6) 細胞増殖を抑制する作用を有するペプチド、それをコードする遺伝子、及びそれを含有してなる医薬組成物に関する。

50

【0002】

【従来の技術】

既知ペプチドであるカルシトニンは、32個のアミノ酸からなるポリペプチドホルモンである。哺乳動物では甲状腺のC細胞から分泌され、血液カルシウムを低下させる作用を有する。高カルシウム血症や代謝性骨疾患などの治療薬として利用されている。カルシトニンは、甲状腺など末梢系に存在するとされていて中枢神経系には発現していないとされていた。しかし、カルシトニン受容体は中枢神経系にも存在し、中枢神経系におけるカルシトニン受容体の存在意義や作用についての解明が求められていた。

また、カルシトニン遺伝子関連ペプチド (CGRP) はアミノ酸37個からなる蛋白質であり、カルシトニンと同じ遺伝子から転写されたmRNAが、カルシトニンとは異なるスプライシングを受けて生成されるものである。カルシトニン遺伝子関連ペプチド (CGRP) は、カルシトニンと同様な血液カルシウム濃度を低下させる作用も有するが、カリウムイオンチャネルの活性化作用やアセチルコリン受容体の数を増加させる作用などもあり、神経伝達物質である可能性もあるとされている。¹⁰

しかし、これらの蛋白質は中枢神経系のカルシトニン受容体に直接作用するものであると確認されておらず、中枢神経系のカルシトニン受容体に直接作用するペプチドの決定が求められていた。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、中枢神経系に発現し、カルシトニン受容体に作用する新規かつ有用なペプチド、その遺伝子、及びそれを含有してなる医薬組成物を提供することを目的としている。²⁰

【0004】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、中枢神経系からcAMP産生を指標にして新規な生理活性ペプチドを探索してきた結果、カルシトニン受容体を介して細胞に作用すると考えられる新規なペプチドを単離、精製した。この構造は、データベース (Genbank, swissprot, DDBJ) の検索結果から新規配列であることが確認された。本発明者らはこの新規なペプチドがカルシトニン受容体に作用することからカルシトニン受容体刺激ペプチド (Calcitonin Receptor-Stimulating Peptide (CRSP)) と命名した。

【0005】

即ち、本発明は、次の(1)～(6)の性質、

(1) 中枢神経系において発現し、(2) カルシトニン受容体に強く作用し、(3) 細胞のcAMP産生能を促進させ、(4) ナトリウムイオンを濃度依存的に取り込む作用を有し、(5) カルシウムイオンの取り込みを抑制し、(6) 細胞増殖を抑制する作用を有するペプチドに関する。より詳細には、本発明は少なくとも次ぎのアミノ酸配列、

Ser-Cys-Asn-Thr-Ala-Thr-Cys-Met-Thr-His-
10

Arg-Leu-Val-Gly-Leu-Leu-Ser-Arg-Ser-Gly-
20

Ser-Met-Val-Arg-Ser-Asn-Leu-Leu-Pro-Thr-
30

Lys-Met-Gly-Phe-Lys-Val-Phe-Gly-NH₂
38

又はこれらのアミノ酸配列の一部が欠失、置換若しくは付加を受けたアミノ酸配列を有する前記のペプチドに関する。より具体的には、配列表の配列番号1、配列番号2、配列番号6、配列番号9、配列番号12、配列番号16、若しくは配列番号19で示されるアミノ酸配列、又はこれらのアミノ酸配列の一部が欠失、置換若しくは付加を受けたアミノ酸配列を有する前記のペプチドに関する。

【0006】

また、本発明のペプチドはカルシトニン遺伝子関連ペプチド (CGRP) と相同性を有す⁵⁰

るペプチドを含むものであるから、C R S P の有する効果に加えてC G R P に類似した生理活性も期待できる場合がある。即ち、本発明のペプチドは、前記の(1)～(6)の性質に加えて、(7)カルシトニン関連ペプチド受容体に強く作用し、(8)血管の弛緩作用を有し、(9)利尿を促進させ、(10)血管内皮細胞や血管平滑筋、線維芽細胞の増殖能を変化させる作用などのC G R P が有する作用と類似した作用を有することも期待される場合もある。

【0007】

また、本発明は前記した本発明のペプチドをコードする塩基配列を有する遺伝子に関する。より詳細には、本発明は、遺伝子が、配列表の配列番号3、配列番号7、配列番号10、配列番号13、配列番号17、若しくは配列番号20で示される塩基配列を有する前記10した遺伝子に関する。

さらに、本発明は、前記した本発明のペプチド少なくとも1種、及び製薬上許容される担体からなる医薬組成物に関する。より詳細には、本発明は、医薬組成物が、骨粗鬆症の予防・治療剤、癌の予防・治療剤、利尿剤、食欲抑制剤、鎮痛剤、降圧剤、又はP T C A (経皮的冠動脈形成術)後の再狭窄を防ぐための薬剤である前記した医薬組成物に関する。

【0008】

本発明者らは、ブタ脳抽出液から腎臓上皮細胞のc A M P 産生を指標にして2種の新規な生理活性ペプチドを精製した。得られたペプチドのアミノ酸配列を解析したところ、

S e r - C y s - A s n - T h r - A l a - T h r - C y s - M e t - T h r - H i s -
10

A r g - L e u - V a l - G l y - L e u - L e u - S e r - A r g - S e r - G l y -
20

S e r - M e t - V a l - A r g - S e r - A s n - L e u - L e u - P r o - T h r -
30

L y s - M e t - G l y - P h e - L y s - V a l - P h e - G l y - N H ₂
38

という38個のアミノ酸からなるペプチド(以下、このペプチドをC R S P という。)と、そのC末端にさらにグリシンが結合した、

【0009】

S e r - C y s - A s n - T h r - A l a - T h r - C y s - M e t - T h r - H i s -
10

A r g - L e u - V a l - G l y - L e u - L e u - S e r - A r g - S e r - G l y -
20

S e r - M e t - V a l - A r g - S e r - A s n - L e u - L e u - P r o - T h r -
30

L y s - M e t - G l y - P h e - L y s - V a l - P h e - G l y - G l y - O H
39

という39個のアミノ酸からなるペプチド(以下、このペプチドをC R S P - G l y とい
う。)であることがわかった。

そして、これらのペプチドのアミノ酸配列をデータベース(G e n b a n k, s w i s s 40
p r o t, D D B J)で検索したところ、いずれも新規なアミノ酸配列を有するものであることが確認された。

これらのアミノ酸配列を配列表の配列番号1及び2にそれぞれ示す。

【0010】

得られたペプチドのアミノ酸配列に基づいて合成プライマーを作成し、ブタ遺伝子を鑄型にP C R 法で増幅することにより、目的の遺伝子をクローニングした。

用いたプライマーは、アミノ酸配列を基にN末端側として、

T G (C/T) A A (C/T) A C (A/C/G/T) G C (A/C/G/T) A C (A
/C/G/T) T G (C/T) A T G A C、及び、

C末端側として、

CC (A/G) AA (A/C/G/T) AC (C/T) TT (A/G) AA (A/C/G/T) CCCATA

であった。

得られた遺伝子の塩基配列を配列表の配列番号3に示し、それがコードしているアミノ酸配列を以下に示す。

【0011】

Met-Gly-Phe-Trp-Lys-Phe-Pro-Pro-Phe-Leu-
10
Val-Leu-Ser-Ile-Leu-Val-Leu-Tyr-Gln-Ala-
20
Gly-Met-Phe-His-Thr-Ala-Pro-Met-Arg-Ser-
30
Ala-Phe-Gly-Ser-Pro-Phe-Asp-Pro-Ala-Thr-
40
Leu-Ser-Glu-Glu-Glu-Ser-Arg-Leu-Leu-Leu-
50
Ala-Ala-Met-Val-Asn-Asp-Tyr-Glu-Gln-Met-
60
Lys-Ala-Arg-Glu-Met-Gln-Lys-Gln-Arg-Ala-
70
Gln-Gly-Ser-Gly-Ile-Ser-Val-Gln-Lys-Arg-
80
Ser-Cys-Asn-Thr-Ala-Thr-Cys-Met-Thr-His-
90
Arg-Leu-Val-Gly-Leu-Leu-Ser-Arg-Ser-Gly-
100
Ser-Met-Val-Arg-Ser-Asn-Leu-Leu-Pro-Thr-
110
Lys-Met-Gly-Phe-Lys-Val-Phe-Gly-Gly-Arg-
120
Arg-Arg-Asn-Phe-Trp-Ile 126
(式中、下線を引いた81番目～118番目までがCRSPである。)

このアミノ酸配列を配列表の配列番号4に示す。

【0012】

ブタCRSPをプローブにしてウシ及びイヌ甲状腺cDNAライブラリーから本発明のペプチドを得た。

ウシのアミノ酸配列は、アミノ酸の1文字コードで示すと、

ACNTATCMTHRLAGWLSRSG

SMVRSNLLPTKMGFKIFNGP-OH

である。これをアミノ酸の3文字コードで示すと次のようになる。

【0013】

Ala-Cys-Asn-Thr-Ala-Thr-Cys-Met-Thr-His-
10

Arg-Leu-Ala-Gly-Trp-Leu-Ser-Arg-Ser-Gly-
20

Ser-Met-Val-Arg-Ser-Asn-Leu-Leu-Pro-Thr-
30

Lys-Met-Gly-Phe-Lys-Ile-Phe-Asn-Gly-Pro-
OH 40

【0014】

また、イヌのアミノ酸配列は、アミノ酸の1文字コードで示すと、

SCNSATCVAHWLGGLLSRA
G
SVANTNLLPTSMGFKVYN-OH

である。これをアミノ酸の3文字コードで示すと次のようになる。

【0015】

Ser-Cys-Asn-Ser-Ala-Thr-Cys-Val-Ala-His-
10
Trp-Leu-Gly-Gly-Leu-Leu-Ser-Arg-Ala-Gly-
20
Ser-Val-Ala-Asn-Thr-Asn-Leu-Leu-Pro-Thr-
30
Ser-Met-Gly-Phe-Lys-Val-Tyr-Asn-OH
38

【0016】

これらのアミノ酸配列、塩基配列、及び遺伝子がコードしている全アミノ酸配列をそれぞれ配列表に示す。

ウシの本発明のペプチドのアミノ酸配列を配列表の配列番号6に示し、その遺伝子の塩基配列を配列表の配列番号7に示し、その遺伝子に基づくペプチドのアミノ酸配列を配列番号8にそれぞれ示す。

また、イヌの本発明のペプチドのアミノ酸配列を配列表の配列番号9に示し、その遺伝子の塩基配列を配列表の配列番号10に示し、その遺伝子に基づくペプチドのアミノ酸配列を配列番号11にそれぞれ示す。

【0017】

ブタCRSPのコード領域全長をプローブとして、ブタ遺伝子ライブラリーよりCRSPと相同性を有するペプチドをコードする遺伝子を得た。この遺伝子の産物であるペプチドをそれぞれ、CRSP-2、CRSP-3と名付けた。

また、同様にして、ブタカルシトニン(CT)と相同性を持つペプチドをコードする遺伝子を得た。この遺伝子の産物であるペプチドをCT-2と名付けた。CRSP-2のアミノ酸配列は、アミノ酸の3文字コードで示すと次のようになる。

【0018】

Ser-Cys-Asn-Thr-Ala-Ser-Cys-Val-Thr-His-
10
Lys-Met-Thr-Gly-Trp-Leu-Ser-Arg-Ser-Gly-
20
Ser-Val-Ala-Lys-Asn-Asn-Phe-Met-Pro-Thr-
30
Asn-Val-Asp-Ser-Lys-Ile-Leu-NH₂

30

3

7

【0019】

CRSP-3のアミノ酸配列は、アミノ酸の3文字コードで示すと次のようになる。

Ser-Cys-Asn-Thr-Ala-Ile-Cys-Val-Thr-His-
10
Lys-Met-Ala-Gly-Trp-Leu-Ser-Arg-Ser-Gly-
20
Ser-Val-Val-Lys-Asn-Asn-Phe-Met-Pro-Ile-
30
Asn-Met-Gly-Ser-Lys-Val-Leu-NH₂

40

3

37

【0020】

CT-2のアミノ酸配列は、アミノ酸の3文字コードで示すと次のようになる。

50

G l u - C y s - A s n - A s n - L e u - S e r - T h r - C y s - V a l - L e u -
 10
 G l y - T h r - T y r - T h r - T r p - A s p - V a l - A s n - L y s - P h e -
 20
 T y r - A l a - P h e - P r o - L e u - T h r - T h r - T h r - G l y - I l e -
 30
 A r g - V a l - S e r - N H₂ 33
 【0021】

C R S P - 2 のアミノ酸配列を後記配列表の配列番号 12 に示し、その c D N A の塩基配列を配列番号 13 に、その c D N A に基づくペプチド（前駆体ペプチド）のアミノ酸配列 10 を配列番号 14 にそれぞれ示す。また、C R S P - 2 遺伝子の塩基配列を配列番号 15 に示す。

C R S P - 3 のアミノ酸配列を配列表の配列番号 16 に示し、その c D N A の塩基配列を配列番号 17 に、その c D N A に基づくペプチド（前駆体ペプチド）のアミノ酸配列を配列番号 18 にそれぞれ示す。

C T - 2 のアミノ酸配列を配列表の配列番号 19 に示し、その c D N A の塩基配列を配列番号 20 に、その c D N A に基づくペプチド（前駆体ペプチド）のアミノ酸配列を配列番号 21 にそれぞれ示す。また、C R S P - 3 遺伝子及び C T - 2 遺伝子の塩基配列を配列番号 22 に示す。

【0022】

20

図 1 に本発明のペプチドの例としてブタ C R S P の構造を模式的に示す。この例のペプチドの場合は、2 番目の C y s と 7 番目の C y s が - S - S - 結合している。

また、図 2 に、本発明のブタ C R S P (p C R S P) 、ブタカルシトニン遺伝子関連ペプチド (p C G R P - I) 、ヒトカルシトニン遺伝子関連ペプチド I (h C G R P - I) 、ヒトカルシトニン遺伝子関連ペプチド I I (h C G R P - I I) 、ヒトアミリン (h A m y l i n) 、ブタカルシトニン (p C T) 、及びヒトアドレノメデュリン (h A M) のアミノ酸配列を比較したものを示す。

本発明の、C R S P はブタカルシトニン遺伝子関連ペプチド (p C G R P) と 71. 1% 、ヒト C G R P - I と 63. 2% 、ヒト C G R P - I I と 71. 1% とそれぞれアミノ酸配列上の相同性を有している。

30

また、ブタ由来のペプチドについて、各 C R S P と C R G P や A M 、 C T - 2 と C T のアミノ酸の比較を行ったものを図 2 3 に示す。

【0023】

次に C R S P の発現部位を調べるためにノーザンブロッティングを行った結果を図 3 に図面に代わる写真で示す。図 3 中の矢印は、C R S P m R N A の位置を示している。また、各組織のペプチドの含有量を C R S P の抗体を用いてラジオイムノアッセイにより測定した。この測定結果を次の表 1 に示す。

【0024】

【表 1】

ラジオイムノアッセイで測定したCRSPの組織含量

組織	CRSP の免疫活性 (pmol/g 組織)		
大脳皮質	0.29	±	0.04
小脳	0.18	±	0.02
中脳	7.5	±	0.9
海馬	0.78	±	0.16
尾状核	1.3	±	0.1
視床	3.5	±	0.4
視床下部	9.9	±	1.2
橋・延髄	2.2	±	0.3
脊髄	0.52	±	0.06
嗅球	0.74	±	0.22
下垂体前葉	14	±	2
下垂体後葉	96	±	15
肺	0.11	±	0.00
副腎	0.42	±	0.05
腎臓・皮質	0.12	±	0.01
腎臓・髓質	0.088	±	0.039
肝臓	0.13	±	0.02
脾臓	0.11	±	0.01
胃	0.29	±	0.00
小腸	0.072	±	0.018
胰臓	0.066	±	0.010
甲状腺	68	±	39
卵巣	0.18	±	0.09
心房	0.20	±	0.04
心室	0.21	±	0.09
大動脈	0.33	±	0.19

各数値は平均値 ± 標準誤差 (n=3)を表す

【0025】

この結果、本発明のC R S Pは、中枢神経系においては中脳、視床下部に、末梢においては甲状腺に多くの遺伝子発現がみられた。また橋・延髄にも中程度の発現が見られ、大脳、下垂体においても僅かではあるが発現が観察される。一方組織含量は下垂体後葉、甲状腺が最も多く、中脳、視床下部、下垂体前葉にも高い組織含量が観察された。

【0026】

次に、C R S Pの生理活性について検討した。

まず、L L C - P K₁ 細胞を用いてC R S Pのc A M P産生活性を検討した。L L C - P K₁ 細胞の培地にD M E Mに溶解したC R S Pを添加して、分泌されてきたc A M Pの量をc A M P特異的な抗体を用いたラジオイムノアッセイにより定量した。結果を図4に示す。図4の縦軸はc A M Pの產生量 (pmol / 10⁵ 細胞 / 30分) を示し、横軸は各ペプチドの濃度の逆対数 (-log (ペプチド濃度 (M))) を示す。図4の黒丸 (●) 50

は本発明のC R S Pを示し、白丸(○)はブタカルシトニン遺伝子関連ペプチド(p i g C G R P)を示し、白菱形(◇)はブタカルシトニン(p i g C T)をそれぞれ示す。この結果、本発明のC R S Pは、ブタ腎上皮細胞由来のL L C - P K₁細胞の細胞内アデニル酸シクラーゼ活性を濃度依存的に非常に強く(E D₅₀は約1.5 nM)上昇させる。この活性はブタカルシトニン(E D₅₀は約8.7 nM)より約6倍、ブタC G R P(E D₅₀は約62 nM)より約40倍強かった。

【0027】

次に本発明のC R S Pのナトリウムイオン、カルシウムイオンの取り込みの促進作用を検討した。

L L C - P K₁細胞の培養液をハンクスー塩化コリン液に置換し、一定量の放射活性をもつ塩化ナトリウム(²²Na)及びC R S Pをそれぞれ終濃度0 M、10⁻⁸ M、10⁻⁷ M、10⁻⁶ Mになるように添加し、10分後、細胞を洗浄して細胞外液に含まれる²²Naを完全に除去し、細胞内に取り込まれた放射活性をガンマカウンターにより測定した。また同様にL L C - P K₁細胞の培養液をハンクスー塩化コリン液に置換し、一定量の放射活性を持つ塩化ナトリウム(²²Na)及びそれぞれC R S PとNa/H共輸送体阻害剤であるアミロライド誘導体5-(N-エチル-N-イソプロピル)-アミロライド(5-(N-ethyl-N-isopropyl)-amiloride(E I P A))を終濃度C R S P 0 M+E I P A 0 M、C R S P 10⁻⁶ M+E I P A 0 M、C R S P 10⁻⁶ M+E I P A 10⁻⁸ M、C R S P 10⁻⁶ M+E I P A 10⁻⁷ M、C R S P 10⁻⁶ M+E I P A 10⁻⁶ M、C R S P 0 M+E I P A 10⁻⁶ Mとなるよう添加し、10分後、細胞を洗浄して細胞外液に含まれる²²Naを完全に除去し、細胞内に取り込まれた放射活性をガンマカウンターにより測定した。

結果を図5(E I P A非存在下でのナトリウムイオンの取り込み)、図6(E I P A存在下でのナトリウムイオンの取り込み)、及び図7(カルシウムイオンの取り込み)にそれぞれ示す。図5、図6及び図7の縦軸は各イオンの取り込み量(c p m)を示し、横軸に左端はコントロール(ペプチド無添加)を示し、その右は各濃度のC R S Pを示す。図6の横軸のコントロールの右はC R S P単独投与の場合を示し、その右はC R S PとE I P Aの共投与の各濃度を示し、右端はE I P A単独投与の場合を示す。図7中のs C Tは、サケカルシトニンを示す。図5、図6、及び図7中、*印はp<0.05で、**印はp<0.01で、***印はp<0.001で有意差があったことを示す。

この結果、C R S PはL L C - P K₁細胞上のアミロライド感受性Na/H共輸送体を活性化して細胞内へのナトリウムの取り込みを促進する。また細胞内へのカルシウムの取り込みを抑制することがわかった。

【0028】

次にC R S Pによる細胞増殖の抑制作用について検討した。

L L C - P K₁細胞に各濃度の各ペプチドのD M E M溶液を添加し、¹²⁵Iで標識したプロモデオキシウリジンを含むD M E M(0.1% B S Aを含む)を各ウエルに添加して、5時間後核内に取り込まれた放射活性をガンマカウンターにより測定し、細胞増殖に伴って合成されたD N A量を測定した。結果を図8に示す。図8の縦軸は¹²⁵I-D Uの取り込み量(×100 c p m/ウエル)を示し、横軸は各ペプチドの濃度の逆対数(-10⁰ g(ペプチド濃度(M)))を示す。図8の黒丸(●)は本発明のC R S Pを示し、白丸(○)はブタカルシトニン(ブタC T)を示し、白菱形(◇)はサケカルシトニン(サケC T)をそれぞれ示す。

また、細胞の増殖数は、10,000細胞/ウェルのL L C - P K₁細胞に各濃度のC R S PのD M E M溶液を添加し、培養後、培養皿上の細胞をトリプシン-ED T A溶液で剥がし、細胞数を計数板にて計測した。結果を図9に示す。図9の縦軸は細胞数(×1,000細胞/ウェル)を示し、横軸は左端はコントロール(C R S P無添加)を示し、その右は各濃度のC R S Pを示す。*印はp<0.05で有意差があったことを示す。

これらの結果、C R S PはL L C - P K₁細胞の増殖を抑制する作用を有することがわかった。

10

20

30

40

50

【0029】

次に、本発明のCRSPによるカルシトニン受容体への作用を検討した。

ブタカルシトニン受容体(CTR)を哺乳類発現ベクターpcDNA3.1に導入し、アカゲザル腎細胞(COS-7)に発現させてCRSP刺激によるcAMP産生量をラジオイムノアッセイにより測定した。同様にオポッサム腎細胞(OK細胞)にCTRを発現させてCRSP刺激によるcAMP産生量をラジオイムノアッセイ法により、ナトリウムイオンの取り込みを放射活性を持つ塩化ナトリウム(^{22}Na)の取り込みをガンマカウンターで計測することにより測定した。結果を図10(遺伝子工学的にカルシトニン受容体を発現している細胞(COS-7)のCRSP刺激によるcAMP産生能の変化)、図11(ブタカルシトニン受容体(CTR)を発現させたオポッサム腎上皮細胞のcAMP産生能の変化)、及び図12(ブタカルシトニン受容体(CTR)を発現させたオポッサム腎上皮細胞のナトリウムイオンの取り込みの変化)に示す。

図10の縦軸はcAMPの産生量(pmol/ウェル/30分)を示し、横軸は各ペプチド(リガンド)の濃度の逆対数(-log(リガンド濃度(M)))を示す。図10の黒丸(●)は本発明のCRSPを示し、白菱形(◇)はブタカルシトニン(pCT)をそれぞれ示す。図11の縦軸はcAMPの産生量(fmol/ウェル/1時間)を示し、横軸はCRSPの濃度の逆対数(-log(CRSP濃度(M)))を示す。図11の黒丸(●)はブタカルシトニン受容体(CTR)を導入したオポッサム腎上皮細胞の場合を示し、黒四角(■)はオポッサム腎上皮細胞(OK細胞)の場合を示す。図12の縦軸はナトリウムイオンの取り込み量の比(コントロールを100とする)を示し、横軸はCRSPの濃度の逆対数(-log(CRSP濃度(M)))を示す。図12の黒丸(●)はブタカルシトニン受容体(CTR)を導入したオポッサム腎上皮細胞の場合を示し、黒四角(■)はオポッサム腎上皮細胞(OK細胞)の場合を示す。図12において、***印はp<0.001で有意差があったことを示す。

この結果、CTRをCOS-7に発現させてCRSPで刺激すると、細胞内アデニル酸シクラーゼ活性が上昇(ED₅₀は約0.2nM)する。この活性はブタカルシトニン(ED₅₀は約71nM)より約350倍強かった。CRSPのこの作用はブタのカルシトニンより約350倍も強力で、既知の生理活性ペプチドの中で最も強いものである。同様にオポッサム腎上皮細胞(OK細胞)にCTRを発現させてCRSPで刺激すると、細胞内アデニル酸シクラーゼ活性が上昇するのと同時にアミロライド感受性Na/H共輸送体を活性化して細胞内へのナトリウムの取り込みを促進する効果が観察された。

【0030】

さらに、CRSPのラットの血圧及び血漿中イオン濃度の変化について検討した。

生理食塩水に溶解した16nmol/kgに相当する量のCRSPを麻酔条件下でラット頸静脈より短期間に一度に投与して、血漿中カルシウム濃度及び血圧を測定した。結果を図13(CRSP投与による血中カルシウム濃度の変化)及び図14(CRSP投与による血圧の変化)に示す。図13の縦軸は血中カルシウム濃度(mM)を示し、横軸は時間(分)を示す。図14の縦軸は血圧(mmHg)を示し、横軸は時間(分)を示す。図13中の***印はp<0.01で有意差があったことを示す。

この結果、CRSPの投与により、一過性に血漿中カルシウム濃度が低下するが、一方血圧に対しては明確な変動を及ぼさないことがわかった。

【0031】

続いて、CRSPとCRSP-G1yのcAMP産生促進活性の違いについて検討した。ブタカルシトニン受容体(CTR)を哺乳類発現ベクターpcDNA3.1に導入し、アカゲザル腎細胞(COS-7)に発現させてCRSP刺激によるcAMP産生量をラジオイムノアッセイにより測定した。結果を図15に示す。

この結果、CRSPとCRSP-G1yはほぼ同等のcAMP産生活性を有することがわかった。

【0032】

また、ウシ及びイヌから単離してきた本発明のペプチド(ウシCRSP及びイヌCRSP 50

)について、前記したのと同様にしてLLC-PK₁細胞を用いたCRSPのcAMP産生活性を検討した。結果を図16に示す。図16の縦軸はcAMPの産生量(pmol/ウエル/10分)を示し、横軸は添加したCRSPの濃度を示す。

この結果、ウシやイヌのCRSPでもブタCRSPの場合とほぼ同様な結果が得られることがわかった。

【0033】

本発明のペプチドの各種、CRSP、CRSP-2、CRSP-3、CT-2、CT、CGRP、GAPDHの遺伝子発現量をRT-PCRによる高感度定量により測定した。その結果を図24に示す。

CRSP-2及びCRSP-3は中枢及び甲状腺、卵巢に発現が観察された。一方CT-2は何れの組織でもバンドが増幅されず、発現が観察されなかった。CT-2は図24に示された組織以外に限局して発現しているものと考えられる。 10

【0034】

以上のように、本発明のペプチドは、カルシトニンより強くカルシトニン受容体を刺激し、アデニル酸シクラーゼを活性化することが示された。このことは、本発明のペプチドがカルシトニン受容体の真の内因性のリガンドであることを示している。

従って、本発明のペプチドは、末梢の組織のカルシトニン受容体に作用して以下のような薬効を奏するものと考えられる。

カルシトニンはその受容体であるカルシトニン受容体を介して骨へのカルシウムの取り込みを促進させる。本発明のペプチドはカルシトニンと同様にカルシトニン受容体に作用して骨へのカルシウムの取り込みを促進させると考えられる。実際に図13で示したようにラットにおいてこのペプチドの投与により、血漿中のカルシウム濃度の減少が観察された。この結果は骨へのカルシウムの取り込みの促進を裏付けていると考えられる。この作用を利用して骨粗鬆症により低下した骨密度を健常状態に回復させるための薬剤として利用が可能であり、骨粗鬆症の予防・治療剤として使用することができる。 20

また図13に示されるように、本ペプチドは、血漿中のカルシウム濃度を低下させる活性を持っており、アルカローシス等に伴う高カルシウム血症の血漿中カルシウム濃度を通常レベルにまで下げるための薬剤への応用が可能であり、高カルシウム血症の治療・予防剤として使用することができる。

本ペプチドは、腎上皮細胞のアミロライド感受性Na/H共輸送体の作用を活性化する。 30
これはカリウム保持性の利尿剤であるアミロライドの反対方向の活性であり、抗利尿剤として使用できる。

本発明のペプチドは、図8及び図9で示したようにカルシトニン受容体を介して腎上皮細胞の増殖を強く抑制する。カルシトニンはカルシトニン受容体を介して腺ガン細胞等の増殖を強く抑制する事が報告されている(Cancer Res. 1985, 45, 4890-4894他)ため、同様に本発明のペプチドもカルシトニン受容体を介してこれらのガン細胞の増殖をカルシトニンよりも強力に抑制すると考えられ、ガンの治療、予防薬として使用できる。

【0035】

本発明のペプチドは、中枢に大量に発現していることが示された。従来から知られてきたアゴニストであるカルシトニンは中枢における発現が認められず、一方カルシトニン受容体は中枢に発現しているため、この事は本発明のペプチドが中枢における真の内因性リガンドであることを示している。カルシトニンを脳室内に投与すると、食欲の抑制、鎮痛作用を示すことが報告されている。カルシトニンは脳内に発現していないため、本ペプチドが脳内でこれらの作用を担っているものと考えられる。 40

したがって、本発明のペプチドは、中枢神経系のカルシトニン受容体に作用して以下のような薬効を奏するものと考えられる。

カルシトニンは中枢神経系で食欲の抑制に働いていることが報告されている(Science 1979, 206, 850-852, THE BONE 1992, 6, 69-74他)。カルシトニン受容体をカルシトニンよりも強く活性化する事ができる本 50

発明のペプチドは強い食欲抑制作用を示す可能性が強い。本発明のペプチドの投与により肥満及びそれに伴う疾患（高血圧、高脂血症等）の治療・予防薬として使用することができる。

さらに、従来よりカルシトニン製剤がガンの転移や骨粗鬆症等による骨の痛み、偏頭痛、肺炎による痛み等に対し鎮痛作用を示すことが報告されている（Am. J. Med. Sci. 1997, 313, 13-16他）。

カルシトニン受容体をカルシトニンよりも強く活性化する本発明のペプチドは、カルシトニンと同様に強い鎮痛作用を示す可能性が高く、これらの痛みに対する鎮痛剤として有効性を有する。

【0036】

本発明のペプチドは、（1）中枢神経系において発現し、（2）カルシトニン受容体に強く作用し、（3）細胞のcAMP産生能を促進させ、（4）ナトリウムイオンを濃度依存的に取り込む作用を有し、（5）カルシウムイオンの取り込みを抑制し、（6）細胞増殖を抑制する作用を有することを特徴とするものである。これらの作用を有するペプチドであれば、前記したアミノ酸配列を有するものに限定されないが、カルシトニンやカルシトニン遺伝子関連ペプチドのアミノ酸配列と50%以上、好ましくは60%以上の相同意を有するアミノ酸配列からなるペプチドが好ましい。前記した例ではブタからの本発明のペプチドであるCRSPを示してきたが、本発明のペプチドはブタ由来のものに限定されるものではなく、ヒト、ラット、イヌ、ウシなどの哺乳動物、サケなどの魚類動物などに由来するペプチドを包含している。

本発明のペプチドは、天然から抽出などの操作により、分離精製することもできる。また、通常のペプチド合成法により合成することもできる。さらに、本発明の遺伝子を適当なベクターに組み込んで、原核細胞や真核細胞を宿主細胞として遺伝子組換え技術により製造することもできる。

【0037】

本発明の医薬組成物は、本発明のペプチドと製薬上許容される担体からなるものである。本発明の医薬組成物は、非経口投与又は経口投与することができ、好ましくは静脈投与、筋肉投与などの非経口投与される。

本発明の医薬組成物は、注射用製剤、凍結乾燥製剤、直腸投与製剤などに製剤化することができる。また、貼付デバイス、軟膏、貼付剤などの外用剤として製剤化することもできる。さらに、舌下錠として製剤化することもできる。製剤化は通常のペプチド製剤の方法により行うことができる。

本発明の医薬組成物は、有効成分として本発明のペプチドのほかに他の有効成分を組み合わせて使用することもできる。本発明の医薬組成物の投与量としては、有効成分の本発明のペプチドの量として、通常は1日、体重あたり $1\mu\text{g}/\text{kg} \sim 1000\text{mg}/\text{kg}$ 、好ましくは $0.1\text{mg}/\text{kg} \sim 500\text{mg}/\text{kg}$ の範囲で投与することができるが、患者の性状や疾患の症状に応じて適宜変更することができる。本発明のペプチドは、カルシトニンよりも強くカルシトニン受容体に作用するものであることから、従来のカルシトニン製剤と同様に疾患に適用することもできる。

【0038】

本発明のペプチドはまた、カルシトニン遺伝子関連ペプチド（CGRP）に相同意を有するペプチドも含まれるため、上記に記載した目的で利用できるのみならず、CGRPに類似した生理活性を利用することが可能である。

CGRPの生理活性としては、CGRP受容体に強く作用し、細胞内のcAMP産生を促進させる作用が知られている。また、CGRPは血管の弛緩作用を有すること（Regul Pept. 1986, 15, 1-23等）、利尿を促進させること（Proc Soc Exp Biol Med 1998, 188, 316-322等）、血管内皮細胞や血管平滑筋、線維芽細胞などの細胞の増殖能を変化させること（Proc Natl Acad Sci USA. 1990, 87, 3299-3303; Regul Pept 2001, 101, 169-178等）が報告されている。

【0039】

10

20

30

40

50

したがって、本発明のペプチドのなかのある種のもの、特にCGRPとの相同意の高いペプチドについては、(1) 中枢神経系において発現し、(2) カルシトニン受容体に強く作用し、(3) 細胞のcAMP産生能を促進させ、(4) ナトリウムイオンを濃度依存的に取り込む作用を有し、(5) カルシウムイオンの取り込みを抑制し、(6) 細胞増殖を抑制する作用を有する、ことに加え、(7) カルシトニン関連ペプチド受容体に強く作用し、(8) 血管の弛緩作用を有し、(9) 利尿を促進させ、(10) 血管内皮細胞や血管平滑筋、線維芽細胞の増殖能を変化させる作用などのCGRPが有する作用と類似する作用も合わせ持つものであることが期待されるが、必ずしも本発明のペプチドのすべてが(7)～(10)に示される作用を有するものではない。

このようなCGRPの有する作用に基づけば、本発明のペプチドを含む医薬組成物は、前記した本発明の医薬組成物の使用法の他に次の目的に使用する製剤として利用可能である。すなわち、血管の弛緩作用を直接利用した降圧剤、中枢及び末梢神経系を介した血管弛緩作用を利用した降圧剤、利尿剤、血管平滑筋の増殖の抑制を利用したPTCA(経皮的冠動脈形成術)後の再狭窄を防ぐための薬剤などとしても使用できる可能性がある。

【0040】

【実施例】

以下、実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明はこれら実施例により何ら限定されるものではない。

【0041】

実施例1 (CRSPペプチドの抽出、単離)

20

ブタ脳20kgを4倍量の水中で10分間煮沸し、冷却後、最終的に1Mになるよう酢酸を添加してホモジエナライズし、遠心分離で不溶物を除去してブタ脳抽出液を作成した。これを限外濾過(ペリコンカセットPLAC #000-05、ミリポア社)で脱塩し、脱塩後の抽出液に氷冷下、終濃度6.6%になるようにアセトンをゆっくり加えた。沈殿を遠心分離により除去し、上精をエバポレーターによりアセトンを除去した後、逆相のカラム(LC-SORB SPW-C-ODS、ケムコ、1.5 l)に吸着させた。カラムを3倍量の0.5M酢酸で洗浄した後、3倍量の溶出バッファー(水:アセトニトリル:10%トリフルオロ酢酸=40:60:1)でペプチド画分を溶出した。溶出液はエバポレーターによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥した。

凍結乾燥標品は秤量後1M酢酸に溶解し、陽イオン交換樹脂(SP-Sephadex、ファルマシア社、3×28 cm)の充填されたオープンカラムに吸着させ、素通り画分(SP-I)、2Mピリジン(pH 8.0)で溶出された溶出画分(SP-II)、2Mピリジン-酢酸(pH 5.0)で溶出された画分(SP-III)に分画し、SP-II I強イオン性画分を得た。この画分を凍結乾燥した後1M酢酸に溶解し、ゲル濾過(Sephadex G-50、ファルマシア社、7.5×145 cm、1M酢酸、流速100 ml/h)で分子量に応じてフラクションに分画し、分子量1 kDaから5 kDaに相当する部分を集めた。これを再びゲル濾過(Sephadex G-25、ファルマシア社、7.5×145 cm、1M酢酸、流速100 ml/h)で、分子量に応じた画分に分離し、分子量2 kDaから4 kDaに相当する部分を集め、凍結乾燥した。

【0042】

凍結乾燥標品をイオン交換クロマトグラフィー(CM52、Whatman社、2.4×45 cm、A液:10 mMギ酸アンモニウム(pH 6.5):アセトニトリル=9:1、B液:1Mギ酸アンモニウム(pH 6.5):アセトニトリル=9:1、流速35 ml/h)を用いて、10 mMから0.5Mまでギ酸アンモニウムによる濃度勾配溶出を行った。

ここで各画分の1/1000量を凍結乾燥し、凍結乾燥標品をダルベッコ改変イーグル培地(DMEM、0.05%牛血清アルブミンを含む)に溶解した培地でブタ腎臓由来の上皮細胞LLC-PK₁を刺激して37℃1時間インキュベーションし、培地に分泌されるcAMP量をラジオイムノアッセイにより定量した。

方法は未知量のcAMPを含む培地及び既知濃度のcAMPを含む培地100 μlに、450

%になるように無水コハク酸を溶解したジオキサンートリエチルアミン混合液（ジオキサン：トリエチルアミン=4:1）を等量加え、30分間室温で放置してcAMPをサクシニル化し、遠心エバポレーターで乾固した後、1mlの緩衝液（50mM酢酸ナトリウム（pH6.2）、1mMEDTA、0.025%アジ化ナトリウム、0.5%血清アルブミン、0.01% Triton X-100）に溶解し、その内100μlずつを試験管に取り分け、50μlずつ放射性標識したサクシニル化cAMP及び抗体を加え、4℃で48時間放置した。次に100μlの1%γ-グロブリン及び500μlの25%ポリエチレングリコールを添加してよく混和し、遠心分離を行って沈殿の放射活性をガンマカウンターを用いて測定し、既知濃度のcAMPにより作成した標準曲線の放射活性と比較することでcAMP量を定量した。

10

cAMP量の上昇が観察された画分（ギ酸アンモニウム（pH6.5）約0.3M）をさらに陽イオン交換HPLC（TSK-gel CM-2SW、東ソー、7.8×300mm、A液：10mMギ酸アンモニウム（pH3.8）：アセトニトリル=9:1、B液：1Mギ酸アンモニウム（pH3.8）：アセトニトリル=9:1、流速2ml/min）でギ酸アンモニウムの濃度勾配溶出を行った。再びそれぞれの画分の1/1000量を取り、活性を測定し、活性の観察された画分（ギ酸アンモニウム（pH3.8）約0.36M）を、さらに逆相HPLC（C₁₈ 218TP54、Vydac社、4.6×250mm、A液：水：アセトニトリル：10%トリフルオロ酢酸=90:10:1、B液：水：アセトニトリル：10%トリフルオロ酢酸=40:60:1、流速1ml/min）でアセトニトリルによる濃度勾配溶出を行い、活性を持つ画分（アセトニトリル約32%）を得た。これを再び逆相HPLC（diphenyl 219TP5215、Vydac社、2.1×150mm、A液：水：アセトニトリル：10%トリフルオロ酢酸=90:10:1、B液：水：アセトニトリル：10%トリフルオロ酢酸=40:60:1、流速0.2ml/min）にて分離し、（アセトニトリル約29%）最終的な精製標品を得た。

20

約50pmolのペプチドが得られた。このペプチドの分子量は4099で理論上の等電点は12.81と算出された。また上述の通りVydac社のC₁₈カラム（4.6×250mm、218TP54）で0.1%TFA存在下、アセトニトリル濃度約32%で溶出される程度の疎水性を持っていた。

30

【0043】 実施例2 (CRSPのアミノ酸配列の決定)

アミノ酸配列はエドマン法による自動アミノ酸シーケンサーを用いて決定した。まず、5pmolの精製標品をN末端からアミノ酸シーケンサーを用いて解析し、Ser-Xaa-Asn-Thr-Ala-Thr-Xaa-Met-Thr-His-Arg-Leu-Val-Gly-Leu-Leu-Ser-

Arg-Ser-Gly-Ser-Met-Valを決定した。次に10pmolの精製標品をトリプシン分解し、逆相HPLC（C₁₈ 218TP5215、Vydac社、2.1×150mm、A液：水：アセトニトリル：10%トリフルオロ酢酸=90:10:1、B液：水：アセトニトリル：10%トリフルオロ酢酸=40:60:1、流速0.2ml/min）でアセトニトリルによる濃度勾配溶出を行った。得られたピークをアミノ酸シーケンサーで解析し、

Ser-Xaa-Asn-Thr-Ala-Thr-Xaa-Met-Thr-His-Arg、

Leu-Val-Gly-Leu-Leu-Ser-Arg、
Ser-Gly-Ser-Met-Val-Arg、
Ser-Asn-Leu-Leu-Pro-Thr-Lys、
Met-Gly-Phe-Lys、
Val-Phe

の6個のシーケンスを得ることができた。これらの配列とデータベースとの比較から本ペプチドがカルシトニン遺伝子関連ペプチドと相同性を持ち、このペプチドが

40

50

Ser-Cys-Asn-Thr-Ala-Thr-Cys-Met-Thr-His-
 Arg-Leu-Val-Gly-Leu-Leu-Ser-
 Arg-Ser-Gly-Ser-Met-Val-Arg-Ser-Asn-Leu-
 Leu-Pro-Thr-Lys-Met-Gly-Phe-
 Lys-Val-Phe-NH₂
 という配列であると考えられた。

【0044】

一方、質量分析計により分子量を測定したところ、4130.6±0.7Daという結果が得られた。これはアミノ酸配列から予想される4042Daと約89Da異なっていたが、この差異は2個のメチオニンの酸化 (16Da×2) とアミノ酸シーケンサーで判読できなかったC末端のグリシン (57Da) の存在によるものではないかと予想された。¹⁰ 最終的には次の実施例3よりこれらの予想通りに、

Ser-Cys-Asn-Thr-Ala-Thr-Cys-Met-Thr-His-
 Arg-Leu-Val-Gly-Leu-Leu-Ser-
 Arg-Ser-Gly-Ser-Met-Val-Arg-Ser-Asn-Leu-
 Leu-Pro-Thr-Lys-Met-Gly-Phe-
 Lys-Val-Phe-Gly-NH₂

(2番目のCysと7番目のCysの間でジスルフィド結合を形成する。)

であることが明らかになった。

得られたCRSPのアミノ酸配列を配列表の配列番号1に示し、CRSP-Glyのアミ²⁰ノ酸配列を配列番号2に示す。

【0045】

実施例3 (相補的DNA塩基配列及び前駆体アミノ酸配列)

プローブは実施例2のアミノ酸配列を基にN末端側

(TG (C/T) AA (C/T) AC (A/C/G/T) GC (A/C/G/T) AC (A/C/G/T) TG (C/T) ATGAC)

及びC末端側

(CC (A/G) AA (A/C/G/T) AC (C/T) TT (A/G) AA (A/C/G/T) CCCATA)

で合成プライマーを作成し、ブタ遺伝子を鑄型にPCR法で増幅することにより作成した³⁰

。相補的DNA λ ファージライブラリーはブタ視床下部mRNA (3 μ g) よりファルマシア社Time saver cDNA作成キット及びStratagene社の λ ZAPIIを用いて作成した。スクリーニングの方法は大腸菌を λ ファージ (約10万個の独立したクローンを持つ) に感染させてLB培地を含む0.7%アガロースと混合し、LB培地を含む1.5%寒天培地を敷いた培養皿に播き、37°Cで8時間ほど培養した。冷蔵庫で2時間ほど冷却した後、形成したブラークをナイロンフィルターに転写し、アルカリ変性 (0.5M水酸化ナトリウム+1.5M塩化ナトリウム溶液で2分間、0.5Mトリス-塩酸塩 (pH 7.5)+1.5M塩化ナトリウム溶液で2分間、45mMクエン酸ナトリウム (pH 7.0)+450mM塩化ナトリウムで5分間処理を行う) 後、フィルターを80°Cで2時間乾燥させた。次に乾燥したフィルターをプレハイブリダイゼーション液 (50%ホルムアミド、0.09Mクエン酸ナトリウム (pH 7.0)、0.9M塩化ナトリウム、0.5%牛血清アルブミン、0.5%フィコール、0.5%ポリビニルピロリドン、0.5%ラウリル硫酸ナトリウム) に37°Cで2時間浸し、そこに³²Pで標識したプローブを加え、42°Cで16時間ハイブリダイゼーションを行う。フィルターは洗浄液で洗浄 (30mMクエン酸ナトリウム (pH 7.0)、300mM塩化ナトリウム、0.1%ラウリル硫酸ナトリウム溶液、室温5分間を2回、3mMクエン酸ナトリウム (pH 7.0)、30mM 塩化ナトリウム、0.1%ラウリル硫酸ナトリウム溶液、65°C 1時間を2回行う) 後、X線フィルムに感光させ、放射線により感光する部分を培養皿上のブラークと照合し、ブラークから陽性クローンを単離した。⁴⁰

単離された陽性λファージクローンはStratagene社ヘルパーファージR408を用いてDNAシーケンスに適したベクターであるプラスミドpBlue scriptに変換し、塩基配列はサンガー法により決定した。

決定された塩基配列を配列表の配列番号3に示し、そのアミノ酸配列を配列番号4に示す。

得られたCRSPは、ブタカルシトニン(CT)遺伝子関連ペプチド(CGRP)と71.1%、ヒトCGRP-Iと63.2%、ヒトCGRP-IIと71.1%のアミノ酸配列上の相同性を有していた(図2参照)。

【0046】

実施例4 (発現部位)

10

遺伝子の発現量のためのRNAの調製は酸性グアニジンフェノールクロロホルム抽出法により行った。約1gのブタ組織を5mlの変性液(4Mグアニジンチオシアン塩、25mMクエン酸ナトリウム(pH7.0)、0.1M2-メルカプトエタノール、0.5%サルコシン酸ナトリウム)でホモジエナライズし、1/10量の2M酢酸ナトリウム、等量の水飽和フェノール、1/5量のクロロホルムを加えよく攪拌した後、遠心分離を行った。次に水層を分離してそこに等量の2-プロパノールを加えよく攪拌し-20℃で1時間静置し、再び遠心分離し、沈殿(RNA)を回収した。このRNAのうち30μgをホルムアルデヒドーアガロース変性ゲル(1%アガロース、2.2Mホルムアルデヒド、20mM Mops(pH7)、8mM酢酸ナトリウム、1mM EDTA)を用いて電気泳動を行い、泳動後のゲルを十分水洗してホルムアルデヒドを除去した後、0.05M水酸化ナトリウムに15分間、0.3Mクエン酸ナトリウム(pH7)+3M塩化ナトリウム溶液で45分間処理した。次にゲルに含まれるRNAをキャピラリプロット法でナイロンフィルターに転写し、RNAを転写したフィルターを80℃で乾燥させた。次にフィルターをAmbion社のULTRAhybハイブリダイゼーション液に37℃2時間浸した後、CRSPを暗号化している部分(cDNA上の346番目-488番目の間の塩基対)を³²Pで標識したプローブを加え、42℃で16時間ハイブリダイゼーションさせた。ハイブリダイゼーション後、フィルターを洗浄液で洗浄(30mMクエン酸ナトリウム(pH7.0)、300mM塩化ナトリウム、0.1%ラウリル硫酸ナトリウム溶液、室温5分間を2回、1.5mMクエン酸ナトリウム(pH7.0)、15mM塩化ナトリウム、0.1%ラウリル硫酸ナトリウム溶液、65℃1時間を2回行う)後、X線フィルムに感光させ、RNAの定量を行った。

20

結果を図3に示す。

30

【0047】

実施例5 (発現量の測定)

各組織のペプチド含量は合成ペプチドに対して作成した抗体を利用してラジオイムノアッセイにより測定した。組織約1gを10倍量の水で煮沸し、氷冷後酢酸を1Mになるよう加え、ホモジエナライズ後、遠心分離により不溶物を除去して抽出液を作成した。この抽出液を凍結乾燥後、緩衝液(50mMリン酸ナトリウム(pH7.4)80mM塩化ナトリウム、25mM EDTA、0.5%Triton X-100, 0.5%牛血清アルブミン0.05%アジ化ナトリウム)に溶解し、100μlずつ試験管に取り分けた。これらのCRSPを含む緩衝液及び既知濃度のCRSPを溶解した緩衝液に等量の放射性標識したCRSP及び抗体を加えて攪拌し、48時間4℃で静置した後、100μlのγ-globulin及び500μlの23%ポリエチレングリコールを添加してよく混和し、遠心後、沈殿の放射活性を既知濃度のCRSPにより作成した標準曲線の放射活性と比較することでCRSP量を定量した。

40

結果を表1に示す。表1は段落番号24に記載したものである。

【0048】

実施例6 (LLC-PK₁細胞におけるCRSPのcAMP産生促進作用)

LLC-PK₁細胞を栄養培地(10%牛胎児血清を含むダルベッコ改変イーグル培地(DMEM))中で培養し、2日後、0.05%牛血清アルブミンを含むDMEMに溶解し

50

たC R S Pを細胞の栄養培地と置き換えて30分間インキュベーション後、培地を回収して、分泌されてきたc A M Pの量をc A M P特異的な抗体を用いたラジオイムノアッセイにより定量した。

結果を図4に示す。

【0049】

実施例7 (L L C - P K₁ 細胞におけるC R S P存在下でのナトリウムイオン、カルシウムイオンの取り込みの作用)

L L C - P K₁ 細胞を6ウェル培養皿上、D M E M (10% F C Sを含む) 中で2日間培養した。ナトリウムイオンの取り込みの測定は以下のように行った。L L C - P K₁ 細胞の培養液をハンクスー塩化コリン液に置換し、一定量の放射活性をもつ塩化ナトリウム (10² ² N a) 及びC R S Pをそれぞれ終濃度0 M、10⁻⁸ M、10⁻⁷ M、10⁻⁶ Mになるように添加し、10分後、細胞を洗浄して細胞外液に含まれる² ² N aを完全に除去し、細胞内に取り込まれた放射活性をガンマカウンターにより測定した。また同様にL L C - P K₁ 細胞の培養液をハンクスー塩化コリン液に置換し、一定量の放射活性を持つ塩化ナトリウム (2² N a) 及びそれぞれC R S PとN a / H共輸送体阻害剤であるアミロライド誘導体5-(N-エチル-N-イソプロピル)-アミロライド (5-(N-ethyl-N-isopropyl)-amiloride (E I P A)) を終濃度C R S P 0 M+E I P A 0 M、C R S P 10⁻⁶ M+E I P A 0 M、C R S P 10⁻⁶ M+E I P A 10⁻⁸ M、C R S P 10⁻⁶ M+E I P A 10⁻⁷ M、C R S P 10⁻⁶ M+E I P A 10⁻⁶ M、C R S P 0 M+E I P A 10⁻⁶ Mとなるよう添加し、10分後、細胞を洗浄して細胞外液に含まれる² ² N aを完全に除去し、細胞内に取り込まれた放射活性をガンマカウンターにより測定した。

E I P Aの非存在下における結果を図5に、またE I P A存在下における結果を図6にそれぞれ示す。

【0050】

カルシウムイオンの取り込みは以下のように行った。L L C - P K₁ 細胞は塩化カルシウム濃度を0 mMに下げたハンクス液 (カルシウムフリーハンクス液) で洗浄した。C R S Pと共に塩化カルシウム (4⁵ C a) を細胞上のカルシウムフリーハンクス液に添加し、10分後、細胞を洗浄して細胞外液に含まれる⁴ ⁵ C aを完全に洗浄し、細胞内に取り込まれた放射活性を液体シンチレーションカウンターにより測定した。

30

結果を図7に示す。

【0051】

実施例8 (C R S Pによる細胞増殖の抑制)

L L C - P K₁ 細胞を24ウェルコラーゲンプレート上、D M E M (10% F C Sを含む) 中で2日間培養し、細胞をD M E Mで一度洗った後、0, 10⁻¹ M ~ 10⁻⁶ MのC R S Pを含むD M E M (10% F C Sを含む) に置換し培養した。2時間後、¹ ² ⁵ Iで標識したプロモデオキシウリジンを含むD M E M (0, 1% B S Aを含む) を各ウェルに添加して、5時間後核内に取り込まれた放射活性をガンマカウンターにより測定し、細胞増殖に伴って合成されたD N A量を測定した。

40

結果を図8に示す。

同様に10,000細胞/ウェルのL L C - P K₁ 細胞を24ウェルコラーゲンプレートに播き、D M E M (10% F C Sを含む) で24時間培養した。各ウェルをD M E Mで一度洗った後、0 M、10⁻⁸ M、10⁻⁶ Mの濃度のC R S Pを含むD M E M (10% F C Sを含む) に培地を置換し培養した。24時間後、培養皿上の細胞をトリプシン-E D T A溶液で剥がし、細胞数を計数板にて計測した。

結果を図9に示す。

【0052】

実施例9 (カルシトニン受容体へのC R S Pの作用)

ブタカルシトニン受容体 (C T R) を哺乳類発現ベクターp c D N A 3. 1に導入し、アカゲザル腎細胞 (C O S - 7) に発現させてC R S P刺激によるc A M P産生量をラジオ 50

イムノアッセイにより測定した。

結果を図10に示す。

同様にオポッサム腎細胞(OK細胞)にCTRを発現させてCRSP刺激によるcAMP産生量をラジオイムノアッセイ法により、ナトリウムイオンの取り込みを放射活性を持つ塩化ナトリウム(²²Na)の取り込みをガンマカウンターで計測することにより測定した。

結果を図11及び図12にそれぞれ示す。

【0053】

実施例10 (CRSPのラットの血圧及び血漿中イオン濃度の変化)

生理食塩水に溶解した16nmol/kgに相当する量のCRSPを麻酔条件下でラット¹⁰頸静脈より短期間に一度に投与した。

結果を図13及び図14に示す。

【0054】

実施例11 (CRSP-G1yペプチドの抽出、単離)

ブタ脳20kgを4倍量の水中で10分間煮沸し、冷却後、最終的に1Mになるよう酢酸を添加してホモジエナライズし、遠心分離で不溶物を除去してブタ脳抽出液を作成した。これを限外濾過(ペリコンカセットPLAC#000-05、ミリポア社)で脱塩し、脱塩後の抽出液に氷冷下、終濃度6.6%になるようにアセトンをゆっくり加えた。沈殿を遠心分離により除去し、上精をエバポレーターによりアセトンを除去した後、逆相のカラム(LC-SORB SPW-C-ODS、ケムコ、1.5 1)に吸着させた。カラムを3倍量の0.5M酢酸で洗浄した後、3倍量の溶出バッファー(水:アセトニトリル:10%トリフルオロ酢酸=40:60:1)でペプチド画分を溶出した。溶出液はエバポレーターによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥した。凍結乾燥標品は秤量後1M酢酸に溶解し、陽イオン交換樹脂(SP-Sephadex、ファルマシア社、3×28cm)の充填されたオープンカラムに吸着させ、素通り画分(SP-I)、2Mピリジン(pH8.0)で溶出される溶出画分(SP-II)、2Mピリジン-酢酸(pH5.0)で溶出される画分(SP-III)に分画し、SP-III強イオン性画分を得た。この画分を凍結乾燥した後1M酢酸に溶解し、ゲル濾過(Sephadex G-50、ファルマシア社、7.5×145cm、1M酢酸、流速100ml/h)で分子量に応じてフラクションに分画し、分子量1kDaから5kDaに相当する部分を集めた。これを再びゲル濾過(Sephadex G-25、ファルマシア社、7.5×145cm、1M酢酸、流速100ml/h)で、分子量に応じた画分に分離し、分子量2kDaから4kDaに相当する部分を集め、凍結乾燥した。²⁰³⁰

【0055】

凍結乾燥標品をイオン交換クロマトグラフィー(CM52、Whatman社、2.4×45cm、A液:10mMギ酸アンモニウム(pH6.5):アセトニトリル=9:1、B液:1Mギ酸アンモニウム(pH6.5):アセトニトリル=9:1、流速35ml/h)を用いて、10mMから0.5Mまでギ酸アンモニウムによる濃度勾配溶出を行った。

ここで各画分の1/1000量を凍結乾燥し、凍結乾燥標品をダルベッコ改変イーグル培地(DMEM、0.05%牛血清アルブミンを含む)に溶解した培地でブタ腎臓由来の上皮細胞L LC-PK₁を刺激して37℃1時間インキュベーションし、培地に分泌されるcAMP量をラジオイムノアッセイにより定量した。⁴⁰

方法は未知量のcAMPを含む培地及び既知濃度のcAMPを含む培地100μlに、4%になるように無水コハク酸を溶解したジオキサンートリエチルアミン混合液(ジオキサン:トリエチルアミン=4:1)を等量加え、30分間室温で放置してcAMPをサクシニル化し、遠心エバポレーターで乾固した後、1mlの緩衝液(50mM酢酸ナトリウム(pH6.2)、1mM EDTA、0.025%アジ化ナトリウム、0.5%血清アルブミン、0.01% Triton X-100)に溶解し、その内100μlずつを試験管に取り分け、50μlずつ放射性標識したサクシニル化cAMP及び抗体を加え、450

℃で48時間放置した。次に100μlの1%γ-グロブリン及び500μlの25%ポリエチレングリコールを添加してよく混和し、遠心分離を行って沈殿の放射活性をガンマカウンターを用いて測定し、既知濃度のcAMPにより作成した標準曲線の放射活性と比較することでcAMP量を定量した。

CRSP-G1yによるcAMP産生の上昇はギ酸アンモニウム(pH 6.5)約0.27Mで溶出される画分に観察された。さらに陽イオン交換HPLC(TSK-gel CM-2SW、東ソー、7.8×300mm、A液:10mMギ酸アンモニウム(pH 3.8):アセトニトリル=9:1、B液:1Mギ酸アンモニウム(pH 3.8):アセトニトリル=9:1、流速2ml/min)でギ酸アンモニウムの濃度勾配溶出を行った。再びそれぞれの画分の1/1000量を取り、活性を測定し、活性の観察された画分(ギ酸アンモニウム(pH 3.8)約0.36Mで溶出)を、さらに逆相HPLC(C₁₈ 218TP54、Vydac社、4.6×250mm、A液:水:アセトニトリル:10%トリフルオロ酢酸=90:10:1、B液:水:アセトニトリル:10%トリフルオロ酢酸=40:60:1、流速1ml/min)でアセトニトリルによる濃度勾配溶出を行い、活性を持つ画分(アセトニトリル約32%で溶出)を得た。これを再び逆相HPLC(diphenyl 219TP5215、Vydac社、2.1×150mm、A液:水:アセトニトリル:10%トリフルオロ酢酸=90:10:1、B液:水:アセトニトリル:10%トリフルオロ酢酸=40:60:1、流速0.2ml/min)にて分離し、(アセトニトリル約29%で溶出)最終的な精製標品を得た。

実際の精製行程において約50pmolのペプチドが得られた。このペプチドの分子量は4157Daで理論上の等電点は11.41と算出された。また上述の通りVydac社のC₁₈カラム(4.6×250mm、218TP54)で0.1%TFA存在下、アセトニトリル濃度約32%で溶出される程度の疎水性を持っていた。

【0056】

実施例12 (CRSP-G1yのcAMP産生促進作用)

ブタカルシトニン受容体(CTR)を哺乳類発現ベクターpCDNA3.1に導入し、アカゲザル腎細胞(COS-7)に発現させてCRSP又は、CRSP-G1y刺激によるcAMP産生量をラジオイムノアッセイにより測定した。

結果を図15に示す。

【0057】

実施例13 (イヌ・ウシCRSPの遺伝子クローニング)

mRNAはイヌ及びウシの甲状腺より、酸性グアニジンフェノールクロロホルム抽出法により抽出した。mRNAの精製は宝酒造Oligotex-dT30 mRNA精製キットを用いて行った。相補的DNAλファージライブラリーはイヌ及びウシの甲状腺mRNA(3μg)よりファルマシア社Time saver cDNA作成キット及びStratagene社λZAPIIを用いて作成した。プローブはブタカルシトニン受容体刺激ペプチドの全長約700bpを用いた。スクリーニングの方法は大腸菌をλファージ(約30万個の独立したクローンを持つ)に感染させてLB培地を含む0.7%アガロースと混合し、LB培地を含む1.5%寒天培地を敷いた培養皿に播き、37℃で8時間ほど培養した。冷蔵庫で2時間ほど冷却した後、形成したplaquesをナイロンフィルターに転写し、アルカリ変性(0.5M水酸化ナトリウム+1.5M塩化ナトリウム溶液で2分間、0.5Mトリス-塩酸塩(pH 7.5)+1.5M塩化ナトリウム溶液で2分間、45mMクエン酸ナトリウム(pH 7.0)+450mM塩化ナトリウムで5分間処理を行う)後、フィルターを80℃で2時間処理した。次にフィルターをプレハイブリダイゼーション液(20%ホルムアミド、0.09Mクエン酸ナトリウム(pH 7.0)、0.9M塩化ナトリウム、0.5%牛血清アルブミン、0.5%フィコール、0.5%ポリビニルピロリドン、0.5%ラウリル硫酸ナトリウム)に37℃で2時間浸し、そこに³²Pで標識したプローブを加え、42℃で16時間ハイブリダイゼーションを行った。フィルターは洗浄液で洗浄(30mMクエン酸ナトリウム(pH 7.0)、300mM塩化ナトリウム、0.1%ラウリル硫酸ナトリウム溶液、室温5分間を2回、15mMクエン酸ナトリウム

ム (pH 7.0)、150 mM 塩化ナトリウム、0.1% ラウリル硫酸ナトリウム溶液、60℃ 1 時間を 2 回行う) 後、X 線フィルムに感光させ、放射線により感光する部分を培養皿上のブラークと照合し、ブラークから陽性クローニングを単離した。単離された陽性 λ ファージクローニングは Stratagene 社ヘルパーファージ R408 を用いて cDNA シーケンスに適したベクターであるプラスミド pBlue script に変換し、塩基配列はサンガー法により決定した。

決定されたウシ CRSP をコードする cDNA の塩基配列を後記配列表の配列番号 7 に示し、そのコードするウシ CRSP の前駆体ペプチドのアミノ酸配列を配列番号 8 に示す。また、ウシ CRSP のアミノ酸配列を配列番号 6 に示す。

決定されたイヌ CRSP をコードする cDNA の塩基配列を後記配列表の配列番号 10 に示し、そのコードするイヌ CRSP の前駆体ペプチドのアミノ酸配列を配列番号 11 に示す。また、イヌ CRSP のアミノ酸配列を配列番号 9 に示す。

【0058】

実施例 14 (ウシ CRSP 又はイヌ CRSP 刺激による cAMP 産生量の定量)

LLC-PK₁ 細胞を栄養培地 (10% 牛胎児血清を含むダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM)) 中で培養した。2 日後、細胞を 0.05% 牛血清アルブミンを含む DMEM で 2 回洗浄し、培養皿中の培地を 0.5 mM の 3-イソブチル-1-メチルキサンチン (3-isobutyl-1-methylxanthine) 及び 0.05% 牛血清アルブミンを含む DMEM (DMEM/BSA/IBMX) に置き換えて 37℃ で 30 分間インキュベーションした。インキュベーション後、培地を 0M 及び $10^{-12} \sim 10^{-6}$ M 20 になるよう CRSP を溶解した DMEM/BSA/IBMX に置換し、37℃ で 10 分間インキュベーションした。インキュベーション後、培養皿中の培地を除き、そこにエタノールを加え、細胞を破碎するために培養皿を冷凍庫で一回凍結させた。次にエタノールを試験管に移し、遠心エバポレーターを用いて標品を乾固させた。乾固した標品は DMEM に溶解し、100 μ l ずつ取り分け、4% になるように無水コハク酸を溶解したジオキサンートリエチルアミン混合液 (ジオキサン: トリエチルアミン = 4:1) を等量加え、30 分間室温で放置して cAMP をサクシニル化させた。再び遠心エバポレーターで乾固した後、1 ml の緩衝液 (50 mM 酢酸ナトリウム (pH 6.2)、1 mM EDTA、0.025% アジ化ナトリウム、0.5% 血清アルブミン、0.01% Triton X-100) に溶解し、その内 100 μ l ずつを試験管に取り分け、50 μ l の放射性標識 30 したサクシニル化 cAMP 及び 50 μ l の抗体を加え、4℃ で 48 時間放置した。次に 100 μ l の 1% γ -グロブリン及び 500 μ l の 25% ポリエチレングリコールを添加してよく混和し、遠心分離を行って沈殿の放射活性をガンマカウンターを用いて測定し、既知濃度の cAMP により作成した標準曲線の放射活性と比較することで cAMP 量を定量した。

結果を図 16 に示す。

【0059】

実施例 15 (CRSP-2 及び CRSP-3/CT-2 前駆体遺伝子のクローニング)

ブタ遺伝子ライブラリーはクローンテック社から購入した。プローブはブタカルシトニン受容体刺激ペプチドの前駆体 cDNA 全長約 700 bp を用いた。スクリーニングの方法は大腸菌をブタ遺伝子が挿入された λ ファージ (約 100 万個の独立したクローニングを持ち、その内約 30 万個について行った) に感染させて LB 培地を含む 0.7% アガロースと混合し、LB 培地を含む 1.5% 寒天培地を敷いた培養皿に播き、37℃ で 8 時間ほど培養した。冷蔵庫で 2 時間ほど冷却した後、形成したブラークをナイロンフィルターに転写し、アルカリ変性 (0.5 M 水酸化ナトリウム + 1.5 M 塩化ナトリウム溶液で 2 分間、0.5 M トリス-塩酸塩 (pH 7.5) + 1.5 M 塩化ナトリウム溶液で 2 分間、4.5 mM クエン酸ナトリウム (pH 7.0) + 4.5 mM 塩化ナトリウムで 5 分間処理を行う) 40 後、フィルターを 80℃ で 2 時間処理した。次にフィルターをプレハイブリダイゼーション液 (20% ホルムアミド、0.09 M クエン酸ナトリウム (pH 7.0)、0.9 M 塩化ナトリウム、0.5% 牛血清アルブミン、0.5% フィコール、0.5% ポリビニルピ 50

ロリドン、0.5%ラウリル硫酸ナトリウム)に37℃で2時間浸し、そこに³²Pで標識したプローブを加え、42℃で16時間ハイブリダイゼーションを行った。フィルターは洗浄液で洗浄(30mMクエン酸ナトリウム(pH7.0)、300mM塩化ナトリウム、0.1%ラウリル硫酸ナトリウム溶液、室温5分間を2回、7.5mMクエン酸ナトリウム(pH7.0)、7.5mM塩化ナトリウム、0.1%ラウリル硫酸ナトリウム溶液、55℃、1時間を2回行った)後、X線フィルムに感光させ、放射線により感光する部分を培養皿上のブラークと照合し、ブラークから陽性クローンを単離した。単離された陽性λファージクローンは種々の制限酵素を用いて切断し、サザンプロッティング法により解析を行って制限酵素地図を作製した後、適当な制限酵素を用いて陽性クローンを含むDNAをpBluescriptにサブクローンングした。塩基配列はサンガー法により決定した。スクリーニングの結果、25個の陽性クローンを得ることができた。制限酵素による解析及び塩基配列決定の結果、10個のクローンはCRSPの遺伝子をコードしていることが判明した(図17)。残りの15個のクローンの内、9個は別の遺伝子を(図18及び図19)、6個はさらに別の遺伝子をコードしていることが判った。9個の遺伝子はCRSPと相同意を持った配列を有していた。この遺伝子をCRSP-2と名付けた。また別の6個の遺伝子はCRSPとCTに相同意を有する配列を持っていた。これら遺伝子をCRSP-3及びCT-2と名付けた。図17~19において下線部がエクソンを示す。

CRSP遺伝子の塩基配列を後記配列表の配列番号5に記載する。また、CRSP-2遺伝子を配列表の配列番号15に記載する。CRSP-3遺伝子とCT-2遺伝子を含むDNA断片の塩基配列を配列表の配列番号23に記載する。

【0060】

CRSPやCT/CGRPの遺伝子配列を参考に推定したcDNA配列は図20~22に示す(図20:CRSP-2、図21:CRSP-3、図22:CT-2)。図20~22において、実線で囲まれた部分が成熟ペプチドで、灰色がアミドに変換されると推定されるグリシン、斜体部がシグナルペプチド、図22における成熟体のN末端側にあるグルタミンはピログルタミン酸に変換されると推定される。また各CRSPとCGRPやAM、CT-2とCTのアミノ酸の比較を行ったものが図23である。

CRSP-2のcDNAの塩基配列を後記配列表の配列番号13に、CRSP-3のcDNAを配列番号17に、CT-2のcDNAを配列番号21に記載する。

CRSP-2、CRSP-3とCT-2の成熟体アミノ酸配列は以下であると予想される。

CRSP-2 : Ser-Cys-Asn-Thr-Ala-Ser-Cys-Val-Thr-His	10
Lys-Met-Thr-Gly-Trp-Leu-Ser-Arg-Ser-Gly	20
Ser-Val-Ala-Lys-Asn-Asn-Phe-Met-Pro-Thr	30
Asn-Val-Asp-Ser-Lys-Ile-Leu-NH ₂	37
CRSP-3 : Ser-Cys-Asn-Thr-Ala-Ile-Cys-Val-Thr-His	10
Lys-Met-Ala-Gly-Trp-Leu-Ser-Arg-Ser-Gly	20
Ser-Val-Val-Lys-Asn-Asn-Phe-Met-Pro-Ile	30
Asn-Met-Gly-Ser-Lys-Val-Leu-NH ₂	37
CT-2 : pGlu-Cys-Asn-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Val-Leu	10
Gly-Thr-Tyr-Thr-Trp-Asp-Val-Asn-Lys-Phe	20
Tyr-Ala-Phe-Pro-Leu-Thr-Thr-Gly-Ile	30
Arg-Val-Ser-NH ₂	33

10

20

30

40

50

CRSP-2のアミノ酸配列を後記配列表の配列番号12に、CRSP-3を配列番号16に、CT-2を配列番号19に記載する。

【0061】

実施例16 (CRSP-2の前駆体cDNAクローニング)

cDNAライブラリーはCRSPのcDNAクローニングを行った時に作成したブタ視床下部cDNAが挿入されたλファージライブラリーを用いた。プローブはブタカルシトニン受容体刺激ペプチドの全長約700bpを用いた。スクリーニングの方法は大腸菌をブタ視床下部cDNAが挿入されたλファージに感染させてLB培地を含む0.7%アガロースと混合し、LB培地を含む1.5%寒天培地を敷いた培養皿に播き、37℃で8時間ほど培養した。冷蔵庫で2時間ほど冷却した後、形成したプラーカをナイロンフィルターに転写し、アルカリ変性(0.5M水酸化ナトリウム+1.5M塩化ナトリウム溶液で2分間、0.5Mトリス-塩酸塩(pH7.5)+1.5M塩化ナトリウム溶液で2分間、45mMクエン酸ナトリウム(pH7.0)+450mM塩化ナトリウムで5分間処理を行う)後、フィルターを80℃で2時間処理した。次にフィルターをプレハイブリダイゼーション液(20%ホルムアミド、0.09Mクエン酸ナトリウム(pH7.0)、0.9M塩化ナトリウム、0.5%牛血清アルブミン、0.5%フィコール、0.5%ポリビニルピロリドン、0.5%ラウリル硫酸ナトリウム)に37℃で2時間浸し、そこに³²Pで標識したプローブを加え、42℃で16時間ハイブリダイゼーションを行った。フィルターは洗浄液で洗浄(30mMクエン酸ナトリウム(pH7.0)、300mM塩化ナトリウム、0.1%ラウリル硫酸ナトリウム溶液、室温5分間を2回、15mMクエン酸ナトリウム(pH7.0)、150mM塩化ナトリウム、0.1%ラウリル硫酸ナトリウム溶液、60℃1時間を2回行う)後、X線フィルムに感光させ、放射線により感光する部分を培養皿上のプラーカと照合し、プラーカから陽性クローンを単離した。単離された陽性λファージクローンはStratagene社ヘルパーファージR408を用いてDNAシーケンスに適したベクターであるプラスミドpBlue scriptに変換し、塩基配列はサンガー法により決定した。以上の結果、13個の陽性クローンを得ることができた。その内6個は全てCRSP前駆体cDNAのほぼ全長を含むクローンであり、また別の6個は全てCRSP-2前駆体cDNAのほぼ全長を含むクローンであった(図20)。残りの1個はCRSP-3の3'非翻訳領域をコードする短いクローンであった。

【0062】

実施例17 (CRSP-3及びCT-2 cDNAのクローニング)

ブタ視床下部cDNA(mRNAで20ng分)を鋤型にし、プライマー(CRSP-3:GCCAGCTTACGTCTCCTT及びTCAGGTAAC TGCAATGATT、CT-2:AGCAGCTTGATTCTGCCAC及びACCTCCTCTGATATTCCA)及び宝酒造Pyrobest DNAポリメラーゼを用いて、94℃15秒-55℃15秒-72℃1分-30サイクルのPCR法を行った。増幅されたDNAはアガロースゲル電気泳動を行い、エチジウムプロマイドで染色されたバンドをアガロースゲルから回収した後、Stratagene社pBluescript IIにサブクローニングし、サンガー法により塩基配列を決定した。

CRSP-3のプライマーを用いて増幅されたDNAの塩基配列の解析を行った結果、CRSP-3をコードしている事が判明した(図5)。一方CT-2のプライマーを用いたPCRではDNAの増幅が観察されなかった。

【0063】

実施例18 (RT-PCRによるCRSP、CRSP-2、CRSP-3、CT-2、CT、CGRP、GAPDHの遺伝子発現量の高感度定量)

ブタの各組織のtotal RNA(4μg)及びoligo dTプライマー及び東洋紡Revertase Ace逆転写酵素キットを用いて鋤型cDNAを作成し、そのうち1/40をRT-PCRに用いた。各遺伝子cDNAを増幅するためのPCRは東洋紡rTaqポリメラーゼを用いて94℃15秒-60℃15秒-72℃1分-30サイクルを行い、プライマーは以下の配列を用いた。

10

20

30

40

50

CRSP : CTCTCTGAGGAGGAATCACG 及び GAGTTCAGAGTC
ATAGTAACC

CRSP-2 : CTCACAGAGGAGGAAGTGTG 及び TAGAGTTCA
TTCCTTGGTG

CRSP-3 : AGCAGCTTGATTCTGCCAC 及び TGCAGTGAAA
GCAACTTGAG

CT-2 : AGCAGCTTGATTCTGCCAC 及び ACCTCCCTCTCTG
ATATTCCA

CT : GCCACTCAGTGAGAAGGAAG 及び TGAGGCATGAGGGA
TGAAGC

10

CGRP : GCCACTCAGTGAGAAGGAAG 及び TCACCTTACATGT
GTCCCCA

GAPDH : TCAC TGCCACCCAGAAGACT 及び AGTGGTCTGTTGA
GGGCAATG

増幅されたDNAは3%アガロースゲルで電気泳動を行い、フジフィルムFLA2000を用いて解析した。結果としてCRSP-2及びCRSP-3は中枢及び甲状腺、卵巣に発現が観察された。一方CT-2は何れの組織でもバンドが増幅されず、発現が観察されなかった(図24)。CT-2は図24に示された組織以外に限局して発現しているものと考えられる。

20

【0064】

【発明の効果】

本発明は、中枢神経に発現し、カルシトニン受容体に強く作用する新規かつ有用なペプチドを提供するものである。本発明のペプチドは、カルシトニン遺伝子関連ペプチドと高い相同性を有し、カルシトニンよりも強い作用を有する。また中枢神経系に多量に発現しており、新規なカルシトニン様ペプチドとして骨粗鬆症や鎮痛剤などとして極めて有用なペプチドである。

【0065】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

〈110〉 Japan Science And Technology Corporation
National Cardiovascular Center

〈120〉 A New Peptide Having Production Activity of cAMP

10

〈130〉 PA909444

〈140〉

〈141〉

〈160〉 22

20

〈170〉 PatentIn Ver. 2.1

〈210〉 1

〈211〉 38

〈212〉 PRT

〈213〉 Swine

30

〈220〉

〈221〉 modified amino acid

〈222〉 (38)

〈223〉 glycine amide

〈220〉

40

〈223〉 CRSP

⟨400⟩ 1

Ser Cys Asn Thr Ala Thr Cys Met Thr His Arg Leu Val Gly Leu Leu

1

5

10

15

Ser Arg Ser Gly Ser Met Val Arg Ser Asn Leu Leu Pro Thr Lys Met

20

25

30

10

Gly Phe Lys Val Phe Gly

35

⟨210⟩ 2

⟨211⟩ 39

20

⟨212⟩ PRT

⟨213⟩ Swine

⟨220⟩

⟨223⟩ CRSP-Gly

⟨400⟩ 2

Ser Cys Asn Thr Ala Thr Cys Met Thr His Arg Leu Val Gly Leu Leu

1

5

10

15

10

Ser Arg Ser Gly Ser Met Val Arg Ser Asn Leu Leu Pro Thr Lys Met

20

25

30

Gly Phe Lys Val Phe Gly Gly

35

20

⟨210⟩ 3

⟨211⟩ 679

⟨212⟩ DNA

⟨213⟩ Swine

⟨220⟩

⟨223⟩ CRSP cDNA

30

⟨400⟩ 3

tcaagtgtct ctggcgcttc ttccacagtg ccatacgctg acggccaaacgc tgctgcctct 60

gctccctccct ctgcgtccagt ccacccgttt cctgctgccc gagggggcacc atggggcttct 120

ggaaatttcc gcccttccctg gttcttagca tccctggccct gtaccaggca ggcaatgttcc 180

acacagcacc aatgagggtct gccttggga gccctttaga tcctgcttacc ctctctgagg 240

aggaatcact cctccttttg gctgcaatgg tgaatgacta tgaggcagatg aaggccccgtg 300

agatgcagaa gcagagggca cagggctccg gcatcagtgti ccagaagaga tcctgcaaca 360

40

ctgccacccat cggctgggg gcttgctcag cagatctggg agcatggiga 420
 ggagcaacct gttgcccacc aagatgggct tcaaagtctt tggtgggcgc cgcaggaact 480
 tttggatctg accagtgaaa tgattccagg aggaaggta ctagactct gaactctatt 540
 cgttaattt acaatgaaag caacctacta aaaaatagca tggaagacat ccatgtatgc 600
 atgcttctgg aaactgaaaaa cacttttc ctgaaataa actaaaacta aatgaaaaat 660
 aaaatcaatg catcaatgc 679

10

⟨210⟩ 4

⟨211⟩ 126

⟨212⟩ PRT

⟨213⟩ Swine

⟨220⟩

20

⟨223⟩ precursor peptide of CRSP

⟨400⟩ 4

Met Gly Phe Trp Lys Phe Pro Pro Phe Leu Val Leu Ser Ile Leu Val
 1 5 10 15

Leu Tyr Gln Ala Gly Met Phe His Thr Ala Pro Met Arg Ser Ala Phe
 20 25 30

Gly Ser Pro Phe Asp Pro Ala Thr Leu Ser Glu Glu Glu Ser Arg Leu
 35 40 45

Leu Leu Ala Ala Met Val Asn Asp Tyr Glu Gln Met Lys Ala Arg Glu
 50 55 60

30

40

Met Gln Lys Gln Arg Ala Gln Gly Ser Gly Ile Ser Val Gln Lys Arg

65 70 75 80

Ser Cys Asn Thr Ala Thr Cys Met Thr His Arg Leu Val Gly Leu Leu

85 90 95

Ser Arg Ser Gly Ser Met Val Arg Ser Asn Leu Leu Pro Thr Lys Met

10

100 105 110

Gly Phe Lys Val Phe Gly Gly Arg Arg Arg Asn Phe Trp Ile

115 120 125

⟨210⟩ 5

20

⟨211⟩ 3796

⟨212⟩ DNA

⟨213⟩ Swine

⟨220⟩

⟨223⟩ gene CRSP

30

⟨400⟩ 5

ctcgaggatc ctgcctcttg ttccccacaa atccctgcctt cctgtgcitg attccagctig 60

cctgaatcag acccccgtct tgggcacaga atcatcaacc tgctgcgcatt taaccctccca 120

aaccgcaccc ggacatggta gtcttagggg accggggatg ctttgtaatg ctggactcig 180

ctctacaaaag atcacatagc tggggatgga gagggatgtg agccctgcgaa accgaacagg 240

taaagtttac catgacgtca aactgtccctt aaattcctgc tcactttgcg tggttttttc 300

gttggtgccc accaaccctcc ccaccccttc ccaccccccgc catcaatgac ctcaatgcaa 360

atacaagtgg ggtggtcctg ttggatgcic caggttctgg acgcaagtag tgacacaatc 420

40

tatggatct acacatctca ttttcaccc tcattcaaac tgcatataagc taaaattttt 2220
ttcccaattca aactatcaga aaccaggcaa cctggcigtt tatectgggg agggcaggc 2280
aggagatcg aacctgttt taggcttgct tcccctccctt aggtctgcct ttgggagccc 2340
tttgcctt gctaccctct ctgaggagga atcacgcctc ctttggctg caatggtaa 2400
tgactatgag cagaatgaagg cccgtgagat gcagaagcag agggcacagg gctccggia 2460
aggttccctg cccaaggaca acagggcattc cctttcttcc tctggtcagg cccaggaagg 2520
catatitaa agtcacitaa gagtttctg accccccigg acatgtcigt gggatgatia 2580
tggcatitcc cctgacggcc taggattttc tgctgtgtatg accttttcta gcagaaatac 2640
tcaaggatca ctggccctct caaggcagia gctttccatg acgattcigt cgtacagcac 2700
ctgcactcaa cctctactg acgggccttt tctttttta tcccacaaat cagcatcagt 2760
gtccagaaga gatccgtcaaa cactgccacc tgcatgaccc atcggctggg gggcttgcic 2820
agcagatctg ggagcatggg gaggagcaac ctgttgccca ccaagatggg ctccaaagic 2880
tttggggc gccgcaggaa ctttggatc tgagcagtgg gatgattcca ggaggaaggt 2940
gactgcccctt ttgttaccc tgggtggag gacagaggac tgggtatigc aggggtgcatt 3000
tccacaccctt aaccctctgt gagcgcattgg gggtaaaacc tccacatggc aaggtgccc 3060
caccagtttc tggagaaagg actgataatc cctataactg aaacattggg ctcttcct 3120
ctgtttctcc agtctctccc tggacactg acatcatctg ccagggaaata tagaccctgt 3180
ttacttaaaa cactgttccc tgggtattaa ttgggttcca gctctagcat tagaatttga 3240
aaggtaatga ccctaccctt ttggagcata ccttacaatg ttatgaactt ggagcataga 3300
ctcgattca aatactgtgt ctgttttcca ctaactgtga ccataggcaa gtatgcctct 3360
gagccicagc ttctccctgt aacttgaagg caacaatgt atcccaata taaaaattaa 3420
ttagtataac atatgacaag agcctgttaa ctaagaatta ataacatctt gtatctttt 3480
tccctccatgtt tactatgtt ctctgaaccc tacitcggtt aatttacaat gaaagcaacc 3540
tactaaaaaa tagcatggaa gacatccatg tatgtatgt tctggaaact gaaaacaccc 3600
tttcccttga aataaactaa aactaaatgc aaaataaaat caatgcattca atgcagttac 3660
cttgcgtgtt atatgattctt ataaataigat gcatgtcica ttgggtttaa 3720
tggtagcaaa tctggccctt gtcagccaaac ctgttggtgg gggcagctct gctaaaccctc 3780
agggtcacat gaattc 3796
40

⟨210⟩ 6

⟨211⟩ 40

⟨212⟩ PRT

⟨213⟩ Bos sp.

⟨220⟩

10

⟨223⟩ BosCRSP

⟨400⟩ 6

Ala Cys Asn Thr Ala Thr Cys Met Thr His Arg Leu Ala Gly Trp Leu

1

5

10

15

Ser Arg Ser Gly Ser Met Val Arg Ser Asn Leu Leu Pro Thr Lys Met

20

20

25

30

Gly Phe Lys Ile Phe Asn Gly Pro

35

40

⟨210⟩ 7

30

⟨211⟩ 649

⟨212⟩ DNA

⟨213⟩ Bos sp.

⟨220⟩

⟨223⟩ BosCRSP cDNA

40

⟨400⟩ 7

tgtctctgcc acttctgccca gactgccact gcctgcgtgcc aaagctactg ctgctgctcc 60
 ttccctctgt cccagccacc tggtgccggc tgcagagag gtgtcatggg ctctggaaag 120
 ttccccccat tcttggtcct cagcatcccg gtcttgcacc aggcaggcat gtttcatgca 180
 gcaccatca ggtctgtctt tgcggcgt ttgcattcg ctaccctgga tgaggaggaa 240
 tcgcgcctcc tactggcigc gatggigaat gactacgagc agatgaggc cggggagtcg 300
 gagaaggcgc agaagaccga gggctccgc atccagaaga gagectgcaa cactgccacc 360
 tgcattgaccc atcgcctggc aggctggcig agcagatctg ggagttatgggt gaggagcaac 420
 ttgcgtgccga ccaagatggg ttcaagatc ttcaatggc cccgcaggaa ctccctggttt 480
 taaacagtga aatgacgctg ggaataaggt caccaggaag ctgaactcta cttttagttt 540
 gcatgaaggc accttacaaa aaaagaaaat agcatggaag atacccatgt atgcattgcit 600
 ctgcatatttggaaatccctt gaaataaaact aaatgcaga 649

10

20

<210> 8
 <211> 125
 <212> PRT
 <213> Bos sp.

<220>
 <223> precursor peptide of BosCRSP

30

<400> 8
 Met Gly Phe Trp Lys Phe Pro Pro Phe Leu Val Leu Ser Ile Leu Val
 1 5 10 15

Leu Tyr Gln Ala Gly Met Phe His Ala Ala Pro Phe Arg Ser Val Phe
 20 25 30

40

Asp Gly Arg Phe Asp Pro Ala Thr Leu Asp Glu Glu Ser Arg Leu

35

40

45

Leu Leu Ala Ala Met Val Asn Asp Tyr Glu Gln Met Arg Ala Arg Glu

50

55

60

Ser Glu Lys Ala Gln Lys Thr Glu Gly Ser Arg Ile Gln Lys Arg Ala

65

70

75

80

10

Cys Asn Thr Ala Thr Cys Met Thr His Arg Leu Ala Gly Trp Leu Ser

85

90

95

Arg Ser Gly Ser Met Val Arg Ser Asn Leu Leu Pro Thr Lys Met Gly

100

105

110

20

Phe Lys Ile Phe Asn Gly Pro Arg Arg Asn Ser Trp Phe

115

120

125

30

⟨210⟩ 9

⟨211⟩ 38

⟨212⟩ PRT

⟨213⟩ Canis sp.

⟨220⟩

⟨223⟩ CanisCRSP

⟨400⟩ 9

Ser Cys Asn Ser Ala Thr Cys Val Ala His Trp Leu Gly Gly Leu Leu

40

1

5

10

15

Ser Arg Ala Gly Ser Val Ala Asn Thr Asn Leu Leu Pro Thr Ser Met

20

25

30

Gly Phe Lys Val Tyr Asn

35

10

⟨210⟩ 10

⟨211⟩ 686

⟨212⟩ DNA

⟨213⟩ Canis sp.

⟨220⟩

20

⟨223⟩ CanisCRSP cDNA

⟨400⟩ 10

tctgccacat ccacggtgcc atcgccctgac atcgacgccc aacactgcca cagctgccgc 60
cgccctgigct ccgagccacc ggctgcccgc agacagagaa gcgtcatggg ctcttggaaag 120
ttctccctt tccctgggtct cggcattctg gcgcgtgtacc aggtggcctt cctccaggca 180
gcaccattca ggctcgtctt gaaaaatcct ccagacictg gtgtgcgcaa tgaggaggaa 240
ttgcgcctcc tccctggctgc agtgtatgaa gactatatgc agatgaagac tcatgagctg 300
gaggcaggagc aggagacatga gggctccagg gtgtctgtcc agaagagatc ctgcactct 360
gccaccctgg tggcccatgg gctgggaggc ttgttgcgca gagccggaaag tgiggcaaac 420
accaacttgc tggccaccag catggcttc aaggttacaca atcgacgccc cagggacat 480
aaggcttaag cagtgcacatg accccaggaa gaagggtcacc atgtatgtaa ctctacttct 540
cttaacttctt aatgaaaaca acttatagaa tgcagagcat ggaagacaca tacatatgca 600
tgcttactat taaaacattt tttttttt gaaataaagt aaaactaaat aaagagaata 660
aaatcataaa aaaaaaaaaa aaaaaaa 686

30

40

〈210〉 11
〈211〉 127
〈212〉 PRT
〈213〉 *Canis* sp.

10

〈220〉
〈223〉 precursor peptide of *Canis* CRSP

〈400〉 11

Met Gly Phe Trp Lys Phe Ser Pro Phe Leu Val Leu Gly Ile Leu Ala
1 5 10 15

20

Leu Tyr Gln Val Gly Phe Leu Gln Ala Ala Pro Phe Arg Ser Ala Leu
20 25 30

Glu Asn Pro Pro Asp Ser Gly Val Arg Asn Glu Glu Glu Leu Arg Leu
35 40 45

Leu Leu Ala Ala Val Met Lys Asp Tyr Met Gln Met Lys Thr His Glu
50 55 60

30

Leu Glu Gln Glu Gln Glu Thr Glu Gly Ser Arg Val Ala Val Gln Lys
65 70 75 80

Arg Ser Cys Asn Ser Ala Thr Cys Val Ala His Trp Leu Gly Gly Leu
85 90 95

40

Leu Ser Arg Ala Gly Ser Val Ala Asn Thr Asn Leu Leu Pro Thr Ser

100

105

110

Met Gly Phe Lys Val Tyr Asn Arg Arg Arg Glu Leu Lys Ala

115

120

125

10

⟨210⟩ 12

⟨211⟩ 37

⟨212⟩ PRT

⟨213⟩ Swine

⟨220⟩

⟨221⟩ modified amino acid

20

⟨222⟩ (37)

⟨223⟩ Leucine amide

⟨220⟩

⟨223⟩ CRSP-2

⟨400⟩ 12

30

Ser Cys Asn Thr Ala Ser Cys Val Thr His Lys Met Thr Gly Trp Leu

1

5

10

15

Ser Arg Ser Gly Ser Val Ala Lys Asn Asn Phe Met Pro Thr Asn Val

20

25

30

Asp Ser Lys Ile Leu

40

35

〈210〉 13

〈211〉 690

〈212〉 DNA

〈213〉 Swine

10

〈220〉

〈223〉 CRSP-2 cDNA

〈400〉 13

ctcaagggtc tctggcgctt cttccacagt gccatgcgc gacgccaacg ctgtgcgc 60
tgctccctcc tctgctccag tccacctgg tccgtgcgc cgagggcac caigggcttc 120
tggaaatttc cgcccttcctt ggttctcagc atcctggtcc tgtaccaggc aggcatgttc 180
cacacagcac ccgtgagatt gccttggag agcagcittg attctgccac tctcacagag 240
gaggaagtgt cccttctact ggttgcattt gtgaaggatt atgtgcagat gaaggccact 300
gtgctggagc aggagtccaga ggacttcagc atcactgccc aggagaaaatc ctgcaacact 360
gttagctgtg tgacccacaa gatgacaggc tggctgagca gatctggag cgtggctaag 420
aacaacttca tgcccaccaa tggactcc aaaatctgg gctgacgccc cagagaggct 480
caggccctgag ctgtgaaatg actccacaaa gaaggtcacc aaggaaciga acitatttc 540
ttttaaatctg caatgaaagc aatttatgg aaaaatagca tggaaaacac acatatatgc 600
atgcttttttg ctgaaatac agcttttagc ttgaaataaa ctaaaactaa atgcagaata 660
aaatcaatgc agctacciga aaaaaaaaaa 690

20

30

〈210〉 14

〈211〉 117

〈212〉 PRT

40

〈213〉 Swine

(220)

(223) precursor peptide of CRSP-2

(400) 14

Met Gly Phe Trp Lys Phe Pro Pro Phe Leu Val Leu Ser Ile Leu Val

1 5 10 15 10

Leu Tyr Gln Ala Gly Met Phe His Thr Ala Pro Val Arg Leu Pro Leu

20 25 30

Glu Ser Ser Phe Asp Ser Ala Thr Leu Thr Glu Glu Glu Val Ser Leu

35 40 45

20

Leu Leu Val Ala Met Val Lys Asp Tyr Val Gln Met Lys Ala Thr Val

50 55 60

Leu Glu Gln Glu Ser Glu Asp Phe Ser Ile Thr Ala Gln Glu Lys Ser

65 70 75 80

Cys Asn Thr Ala Ser Cys Val Thr His Lys Met Thr Gly Trp Leu Ser

85 90 95

30

Arg Ser Gly Ser Val Ala Lys Asn Asn Phe Met Pro Thr Asn Val Asp

100 105 110

Ser Lys Ile Leu Gly

115 40

〈210〉 15

〈211〉 7673

〈212〉 DNA

〈213〉 Swine

〈220〉

10

〈223〉 gene CRSP-2

〈400〉 15

ggatccacta gttctagata aaatggacaa atacctagaa acagaagacc taccaagaatg 60
gaaggatgaa gaaatagaaa attcaaatac accatgtact aggaaggaga atgaagcait 120
aatccaaaat ctccaacaa agaaaagccc tggatacgat ggcctcaitg gigaatagta 180
ccagacattt aaagaaaaacg aataccaatc ctgtcaaac tttccaaaaa acctgaagag 240
aaaggacaca ccctaaccctt ttctatgagg caggccaaca ttactctgtat accaaagaatg 300
gagaaaagatt ctgcaaggag aaaacccctt cagacaaaat cctttatgac atggatgtgg 360
aaacccctcaa cagtatgcta gggaaatgaa ttcaagaagcg tattaaaagg atcctacaac 420
atgaccaagt gggatgaatt tctggaatgc aaggatgatt caaaataatga aaattgtatca 480
aagtgttata tcacaataat ggaatgtagg gaaaaacaca cctgatttatt tccactgata 540
cagaaaaattt ttagtaaaaa ttcaataacctt ttcaggatt aaaaacaaaa actaggtata 600
gaaggagact gcctcagcac aatacaacta tatatgaaaa accaacacca acaccataat 660
ccagggtgga aaactgaaag ctttccctt aagatcigga agaaaatgga aaaaaatttt 720
taagaatttt cagacagatt tgggtctctg gtacacictg agaaatcatc ttttagaaat 780
ttttttttt aaaaataagc acaagaattt cattaaaag aagggaaata acatagccit 840
cagagttat caggaggigt aatttttttt tccacactag attgtggcta ccigatgctt 900
attttgaggt ttaaacataa taaaataaga tttcacagcc aagtgcacgc tagtcatgga 960
acttttacct cagtactgtt tagtgcttca gtcctaagaa gtttcaggga gggctgcgtg 1020
caatacaagt aatcggtact tgctgaaggt ctaaaatttc gagtgcaactt ggtaaatcag 1080
ggatgggcgc agaggagact gtttctgtaa ctcagactag tgaacccctt aattttagaaa 1140

20

30

40

gggtacitccaaatccgt tctacciaac taggtccaaa tgctctgcag 1200
gctgttagtta gagccctetc atagcagggta gactgccttg gtgaatcigc cagaggaaat 1260
gaatttccat tcacattcat tcaacaaaca ttggcgagt gccacctcat gtcaaaaca 1320
tggtgcttaag tgctaaagaa aagatgttgtt tttgtaaact taccgcagc tcagagccag 1380
gacttcitgg aaagtcagag gacttgagga aggagtcat ctccgcctt ccctcactgg 1440
agagactggc ttttcttcc aagttaaagct taaaactgtt ggaggcttaag ttacgaccct 1500
ctggggcag accctgatc ctgccttc tccccagccc ttgtgttg ggcgc当地 1560
atttcigagt gaggaatgaa tggggctt gaacaggaaa ggcacaatgt gcagccaagg 1620
gttagaaatgtt gacccatcaa attaacaatgtt ttaacaaatgtt gcttctaaa ggagtctttt 1680
cttagccata gtgcagccac ctgtcatgtt atcaaaaactg tggttcttcc aatgaaaaaaa 1740
gacatccccca gacacacata cttaacaaatgtt atttcagaag attgtatgtt cgaaaatctc 1800
aggtttttggaa ttttattttttt aaaaatgtt tggcccttgg tttttttttt 1860
ttttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 1920
gcttagggc taataggcgc catagccacc ggcttacgccc agagctactg caacgcttgg 1980
tccgagccgc atctgcaacc tacaccacaa ctacggcaa tgccggatcg ttaacccact 2040
gagcaaggcc agggatcgaa cccgcaaccc catggttttt actcagatc gtttacccact 2100
gcccacgac ggccacttccaa accttaccaga ctcttaatttta agtagcagag tccaaattttac 2160
atgcccaccc acatctgttta ccccgagttt gcaacatgg tcttggact aacttcttac 2220
ggaaagccaa gcccggactt cataattata gtgttgcacc cccaaacccct ggttggccct 2280
gtgttgcaccctt tttttttttt tagtagaaac caggatitac ggagcccgag cagttccgc 2340
tccgttgcaccctt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 2400
ccagtttttc cgttcccttg gtctcccgat ccgttgcata tccgttggag agcgagatgc 2460
aagcacccga tttcccttagcc ccaatattttt atttcgttgc gaaggagaaa agttaataaa 2520
gggtatcttg taaatgagat gtccggatc cagagagcac aaaccggcaa ggggaacaga 2580
tgtggccgca ggcagggttg cggaaagata tagagaaggc tcaaggatgg accctgtggct 2640
cagggtcacac tcatggcaga gttccgttta atttcggctc tccctggggg aaccacttaa 2700
ctggggcttcc tgcgtccctc caccggcccc cgtatgttgc gcaatgttgc cccgttgg 2760
gggtctgtac aggctgttgc ggtttatgtc tgcgttgc gacacggiga tccgttggc 2820
catccgaact ggatgggtt agatggggc acagggttgg aatcacaggt cactggaaaca 2880
10
20
30
40

tcttggcaaa cagcagccgg aagcaagggg cagctggca aatggttctg ggacattgtat 2940
gggcattagat gatgaatgggt ggggcaggag gtccggcttgg cggcttggga agcatctatg 3000
ccgtgcacgt cccgtccccaa gcccaggtagg gcaccatctt tccccatatacg gtggaccgac 3060
caccaggcgc gactccagac atccgcacag aggtggggat tggcaaaatg gatcgcaic 3120
gcacagaatc cccctctgac tttccctggia agccttcic gatccctccc tgggtggaga 3180
gcaggtacat ggctactaat gataccacac tttgaagacg ggaatatgtat gccccgttcc 3240
aaaaatataat atatttgggt gctagaagac actagcccgta tgatcttact acctagaaaa 3300
ggcacagctg gaacaaagt tccgtgtgac aaagacigtg atccctgcctc ttgtttccca 3360
caaattccgtc ctccctgtgc ttgattccag ctgcctgaat cagacccccc gcttggcac 3420
agaatcatca acctgtgtcg cattaaccctc ccaaaccgca ctggacatg gtgtttag 3480
gggaccgggg atgccttgc acgctggact ctgtctaca aagatcacat agctggggat 3540
ggagagggat gtgagccgtc gaaaccgaac agttaaagt taccatgacg tcaaactgtc 3600
cttaaaatcc tgcctacitt gcgtgtgtt ttgcgttggtg cccaccaacc tccccacccc 3660
ctccacccccc cgccatcaat gacctaatacg caaatacaag tgggtggtc ctgttggatg 3720
ctccaggttc tggacgcaag tagtgcacaca atccctgggc tcaggatctt tcctctcaitt 3780
ggttgcctgg agctctggga ccacccaga ttcaagagcgg cggaaataag agcagctgct 3840
ggtgccggga agggtagag gcactaccca cctcaagtgt ctctgcccgt tcttccacag 3900
tgccatcgcc tgacgccaac gctgtgtcct ctgtccctc ctgtgttcca gtcacccctgg 3960
ttccctgtgc ccggtaagcc cggagattcc tgctaaagctg tggttctgtt tctctctccc 4020
tctctccct tccctctctc tccatggat ttcttagct gatctcttt cccgtctcaa 4080
agttccgttc cacttctctc tgggtctctt catcctgtaa tatgccttac tgcgtcaatic 4140
attcttaggtt ccttccacag gtaactctgg atggtcacag ttccgggatt cccgtcttia 4200
ctcttccctga gctgagctgg gctccagtc tgcgtccctc gcagacgigc ttaggtccgt 4260
gttggatit tggagcttc caggcacttc agggagagga ggtatgcagga atagctttga 4320
gcagaagaaa ctctcatgga tcccatctcc tcttacctac aaggatcgct gaaaatgggg 4380
tcgggacctg ggacagtgc aatgggtggc aaatagggtgc aatgactgag gggaaagtag 4440
ctattaaacg caagccccag ttgaagggttc tggaaactcc cccctcccgca cggccacccccc 4500
atttaatctt gggtcccaat ttaaggctgt accggctgtt tcttacagg gtgttcttig 4560
ccagagtaatg gaggcaggctgg acagtaaaat tgggttcttc agtttctcag ggattccaaac 4620

cctctcagag ctgtatit ccactgatgg tcagtctgg gggaaatcac ttgccctcaa 6420
gctgtcattg gcaggccctc tcittgtctc catcctgaaa atcagcatca ctgcccagga 6480
gaaatcctgc aacacigcta gcigtgtgac ccacaagatg acaggctggc tgagcagatc 6540
tgggagcgtg gctaagaaca acttcatgcc caccatgtg gactccaaaa tcttggcig 6600
acgcccaga gaggctcagg cctgagcgt gaaatgactc cacaagaag gtgactgcic 6660
tagaacatgg gatagcaggg caaatggcig ggtatttcag gggtgttggc tacactctaa 6720
ccctccctga gcctgtactg taaaaaaaaa tccataatga agttgtctgac cccattatcc 6780
tcagaaagaa aagagaatcc taatagccaa aacccctata acttaggttc atttctatit 6840
ttttccagtg tcctccagtg actctgaggt catctgicag gaaacataga ttctattctit 6900
ttttctttc ttttggcta cacccaaggc atgtaaaatg ttttggccca gggattgaat 6960
ctgaaccata gctgtgaccc atgcagtacc tggcaaca ctggatccctt aacccaatgt 7020
accacatcag gaactccctag gtccttattat ttaaaacact gttccctgca gtataattt 7080
tgattattct agttttttagt tttagaaaggt aatgatctt tccagtgagt ttgaagtata 7140
actacaatgt cacatataatc tgaattcaga gcattgactt gtttcaaat gcatgtctg 7200
tcttccacta actatacaac catggccag accctcttg aacctcagtt ctacatgaaa 7260
ctttaaggca acaataatat ttacctgtta tcattaatat aaaaagtaac tgagataatt 7320
catggtaaga gcctcactat taataagtaa taataticta gctcttattt tttttctcc 7380
taggtcacca aggaactgaa ctctatttct tttaatctgc aatgaaagca atttatttga 7440
aaaatagcat gggaaacaca catatatgca tgcctctgc ttgaaataca gcttttagct 7500
tgaataaaac taaaactaaa tgcagaataa aatcatigca gctacctgat atgtatcait 7560
ttaatatttgc attctgtatt ctataagtat gactcaigtc tgcgtggctt atctggtagc 7620
aaatctggac cctgtcagcc aacctgttgg tggtggcagc tctgctaaac ctc 7673

〈210〉 16

〈211〉 37

〈212〉 PRT

〈213〉 Swine

40

〈220〉

〈221〉 modified amino acid

〈222〉 (37)

〈223〉 Leucine amide

〈220〉

〈223〉 CRSP-3

10

〈400〉 16

Ser Cys Asn Thr Ala Ile Cys Val Thr His Lys Met Ala Gly Trp Leu

1

5

10

15

Ser Arg Ser Gly Ser Val Val Lys Asn Asn Phe Met Pro Ile Asn Met

20

25

30

20

Gly Ser Lys Val Leu

35

〈210〉 17

〈211〉 685

30

〈212〉 DNA

〈213〉 Swine

〈220〉

〈223〉 CRSP-3 cDNA

〈400〉 17

40

gccccagctta cgtctccittt ctccgcccagt gccatcacctt gccaccagcg cggttgttgc 60

ttctccact tgggcitccaa gctacctgggt tcctgcattcc agagggcac catggcittc 120
 tggaaagtcc ccccttccct gatcctcagc atccctggtcc tgtaccaagc aggaatgctc 180
 catgccgcgc cattcaggat ggcittggga agcagcttig attctgccac actcacggaa 240
 gaggaaatgt ccctccact ggttgcatacg gigaaggatt atgtgcagat gaaggccact 300
 gtgctggagc aggagacaga ggacttcagc atcaccaccc aggagagatc ctgcaacact 360
 gccatctgtg tgacccacaa gatggcaggc tggctgagca gatctggag cgtggtaag 420
 aacaacttca tgcccatcaa catggctcc aaagtcttgg gccggcgccg cagacagcct 480
 cagggctgag ctgtgaaaatg actctaaaaaa gaagttgaac tcaagttgtct ttcactgcaa 540
 agttgcittc cctgcaaatt aaaagaacca atttggaaaa tagcatggaa gacacacata 600
 tatgcattgtcttgcataactt tttgcattgaa acaaactaaa cctaaatgca 660
 gaataaaaatc attgcagttt cctga 685

10

20

<210> 18
 <211> 125
 <212> PRT
 <213> Swine

<220>
 <223> precursor peptide of CRSP-3

30

<400> 18

Met Gly Phe Trp Lys Phe Pro Pro Phe Leu Ile Leu Ser Ile Leu Val

1

5

10

15

Leu Tyr Gln Ala Gly Met Leu His Ala Ala Pro Phe Arg Met Ala Leu

20

25

30

40

Gly Ser Ser Phe Asp Ser Ala Thr Leu Thr Glu Glu Glu Met Ser Leu

35

40

45

Leu Leu Val Ala Met Val Lys Asp Tyr Val Gln Met Lys Ala Thr Val

50

55

60

Leu Glu Gln Glu Thr Glu Asp Phe Ser Ile Thr Thr Gln Glu Arg Ser

65

70

75

80

10

Cys Asn Thr Ala Ile Cys Val Thr His Lys Met Ala Gly Trp Leu Ser

85

90

95

Arg Ser Gly Ser Val Val Lys Asn Asn Phe Met Pro Ile Asn Met Gly

100

105

110

20

Ser Lys Val Leu Gly Arg Arg Arg Gln Pro Gln Ala

115

120

125

30

<210> 19

<211> 33

<212> PRT

<213> Swine

<220>

<221> modified amino acid

<222> (33)

<223> Serine amide

40

<220>

〈221〉 modified amino acid

〈222〉 (1)

〈223〉 pyroglutamic acid

〈220〉

〈223〉 CT-2

10

〈400〉 19

Glu Cys Asn Asn Leu Ser Thr Cys Val Leu Gly Thr Tyr Thr Trp Asp

1

5

10

15

Val Asn Lys Phe Tyr Ala Phe Pro Leu Thr Thr Thr Gly Ile Arg Val

20

25

30

20

Ser

〈210〉 20

〈211〉 802

〈212〉 DNA

30

〈213〉 Swine

〈220〉

〈223〉 CT-2 cDNA

〈400〉 20

gcccagctta cgtciccittt ctccgcccagt gccatcacct gccaccagcg cggttgtttgc 60

40

ttctccact tgggctccaa gctacctggt tcctgtatcc agaggggcac catgggcttc 120

tggaaggttcc cccccttcct gatcctcagc atcctggtcc tgtaccaagc aggaatgctc 180
catgccgcgc cattcaggat ggctttggga agcagctttg attctgccac actcacggaa 240
gaggaaatgt ccctcctact ggttgcaatg gigaaggatt atgtgcagat gaaggccact 300
gtgctggagc aggagacaga ggacttcagc cttggacagct ccagagctaa gcagtgcata 360
aatctgagta cctgtgtgct gggAACATAT acatggacg tcaacaagtt ttatgcattc 420
cccttaacta caactggat tagagtatct ggcaagaaat gggtcaggc cagagtctca 480
gagaaagtcc attatccctc aaggcagcat accctaagg tgcataagaag gcCCCCACCC 540
ctcctccctt ctagttccctc tcctagaatt tgcattgttt cttctctgg tgcctctcga 600
gctgctatca gcagctttcc ttgtggccat ggatgtctgg aatatcagag aggaggtggg 660
gggtgggggc aggccaggcca gaagaaaatc actcaggaat agattaggag agaatggca 720
gccctgtgag tgcctgtgga ttccacagca gagcttctca gtcctgcttc tgaacatgct 780
tttcaactagg gaataaaaat at 802

10

20

⟨210⟩ 21

⟨211⟩ 162

⟨212⟩ PRT

⟨213⟩ Swine

⟨220⟩

⟨223⟩ precursor peptide of CT-2

30

⟨400⟩ 21

Met Gly Phe Trp Lys Phe Pro Pro Phe Leu Ile Leu Ser Ile Leu Val

1

5

10

15

Leu Tyr Gln Ala Gly Met Leu His Ala Ala Pro Phe Arg Met Ala Leu

20

25

30

40

Gly Ser Ser Phe Asp Ser Ala Thr Leu Thr Glu Glu Glu Met Ser Leu

35 40 45

Leu Leu Val Ala Met Val Lys Asp Tyr Val Gln Met Lys Ala Thr Val

50 55 60

Leu Glu Gln Glu Thr Glu Asp Phe Ser Leu Asp Ser Ser Arg Ala Lys

10

65 70 75 80

Gln Cys Asn Asn Leu Ser Thr Cys Val Leu Gly Thr Tyr Thr Trp Asp

85 90 95

Val Asn Lys Phe Tyr Ala Phe Pro Leu Thr Thr Gly Ile Arg Val

100 105 110

20

Ser Gly Lys Lys Trp Val Arg Ala Arg Val Ser Glu Lys Val His Tyr

115 120 125

Pro Ser Arg Gln His Thr Leu Arg Cys Leu Arg Arg Pro Pro Pro Leu

130 135 140

30

Leu Leu Ser Ser Ser Pro Arg Ile Cys Met Cys Ser Ser Leu Val

145 150 155 160

Ala Leu

40

⟨210⟩ 22

⟨211⟩ 7142

〈212〉 DNA

⟨213⟩ Swine

220

⟨223⟩ gene of CRSP-3 and CT-2

10

〈400〉 22

20

30

40

ttaagaaata ataattgagt gtctgtatc tcttgacac tatttaagct ccaggaatag 6540
 agcaataaac agaacagaca aaacccctg cattcatgga gcttataattc taactggaag 6600
 agactgaggt gatacatgct ctggaattag aaacatccag cactggaagg aatctggat 6660
 gtcataaggg tataaaggct tatttgatat agctatitca tggatcaac atccctggca 6720
 tatgctggca atgctggta ccatctgttg actatgactt ccaaggtgac tggacagcc 6780
 gtttcaattgg tggacagtc attaagtggg atatttcca tttagagaagt catcccctac 6840
 tacctacaga ttatagttat ttcttaagaa gcacatagaa ttatgaccct tctcccatc 6900
 attctgttgtt catcacagta acccaaccctt agccataaaag gtatgtcaga ccatgtctcc 6960
 cttaggacag aataactctat tatagactcc ccttctcaca aagtaaacat tttaggcatt 7020
 gcagtgtctt ctaatcaac tctacttgtt cagagtatat gtattaaaat ttacttccaa 7080
 atttggaaatt ccctgggttgtt taaggatcca ctatgtctag agcggccgccc accgcgggtgg 7140
 ag 7142

10

20

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、本発明のペプチドのCRSPの構造を模式的に示すものである。
 【図2】図2は、本発明のペプチドのCRSP(pCRSP)のアミノ酸配列と、ブタカルシトニン遺伝子関連ペプチド(pCGRP-I)、ヒトカルシトニン遺伝子関連ペプチドI(hCGRP-I)、ヒトカルシトニン遺伝子関連ペプチドII(hCGRP-II)、ヒトアミリン(hAmylin)、ブタカルシトニン(pCT)、及びヒトアドレノメデュリン(hAM)のアミノ酸配列との比較を示すものである。

【図3】図3は、本発明のペプチドのCRSPの発現部位を調べるためにノーザンプロットティングを行った結果を示す図面に代わる写真である。図3中の矢印は、CRSPの位置を示している。

【図4】図4は、LLC-PK₁細胞を用いた本発明のペプチドのCRSPのcAMP産生活性を検討した結果を示すものである。図4の縦軸はcAMPの産生量(pmol/10⁵細胞/30分)を示し、横軸は各ペプチドの濃度の逆対数(-log(ペプチド濃度M))を示す。図4の黒丸(●)は本発明のCRSPを示し、白丸(○)はブタカルシトニン遺伝子関連ペプチド(pigCGRP)を示し、白菱形(◇)はブタカルシトニン(pigCT)をそれぞれ示す。

【図5】図5は、LLC-PK₁細胞を用いた本発明のペプチドのCRSPによるEIPA非存在下でのナトリウムイオンの取り込み試験の結果を示すものである。図5の縦軸は各イオンの取り込み量(cpm)を示し、横軸に左端はコントロール(ペプチド無添加)を示し、その右は各濃度のCRSPを示す。***はp<0.001で有意差があったことを示す。

【図6】図6は、LLC-PK₁細胞を用いた本発明のペプチドのCRSPによるEIPA存在下でのナトリウムイオンの取り込み試験の結果を示すものである。図6の縦軸は各イオンの取り込み量(cpm)を示し、横軸に左端はコントロール(ペプチド無添加)を示し、その右は各濃度のCRSPとEIPAを示す。***はp<0.001で有意差があったことを示す。

【図7】図7は、LLC-PK₁細胞を用いた本発明のペプチドのCRSPによるカルシウムイオンの取り込み試験の結果を示すものである。図7の縦軸は各イオンの取り込み量(cpm)を示し、横軸に左端はコントロール(ペプチド無添加)を示し、その右はsCT(サケカルシトニン)及びCRSPを示す。*はp<0.05で、**はp<0.01で有意差があったことを示す。

40

50

【図8】図8は、LLC-PK₁細胞における本発明のペプチドのCRSPによる細胞増殖に伴って合成されたDNA量の測定結果を示す。図8の縦軸は¹⁻²⁻⁵I-DUの取り込み量($\times 100$ cpm/ウェル)を示し、横軸は各ペプチドの濃度の逆対数(-log(ペプチド濃度(M)))を示す。図8の黒丸(●)は本発明のCRSPを示し、白丸(○)はブタカルシトニン(ブタCT)を示し、白菱形(◇)はサケカルシトニン(サケCT)をそれぞれ示す。

【図9】図9は、LLC-PK₁細胞における本発明のペプチドのCRSPによる細胞増殖に伴う細胞数を計数板にて計測結果を示す。図9の縦軸は細胞数($\times 1,000$ 細胞/ウェル)を示し、横軸は左端はコントロール(CRSP無添加)を示し、その右は各濃度のCRSPを示す。*印はp<0.05で有意差があったことを示す。

10

【図10】図10は、遺伝子工学的にカルシトニン受容体を発現している細胞(COS-7)における本発明のペプチドのCRSP刺激によるcAMP産生能測定結果を示す。図10の縦軸はcAMPの産生量(pmol/ウェル/30分)を示し、横軸は各ペプチド(リガンド)の濃度の逆対数(-log(リガンド濃度(M)))を示す。図10の黒丸(●)は本発明のCRSPを示し、白菱形(◇)はブタカルシトニン(pCT)をそれぞれ示す。

【図11】図11は、ブタカルシトニン受容体(CTR)を発現させたオポッサム腎上皮細胞における本発明のペプチドのCRSP刺激によるcAMP産生能測定結果を示す。図11の縦軸はcAMPの産生量(fmol/ウェル/1時間)を示し、横軸はCRSPの濃度の逆対数(-log(CRSP濃度(M)))を示す。図11の黒丸(●)はブタカルシトニン受容体(CTR)を導入したオポッサム腎上皮細胞の場合を示し、黒四角(■)はオポッサム腎上皮細胞(OK細胞)の場合を示す。

20

【図12】図12は、ブタカルシトニン受容体(CTR)を発現させたオポッサム腎上皮細胞における本発明のペプチドのCRSP刺激によるナトリウムイオンの取り込み試験の結果を示す。図12の縦軸はナトリウムイオンの取り込み量の比(コントロールを100とする)を示し、横軸はCRSPの濃度の逆対数(-log(CRSP濃度(M)))を示す。図12の黒丸(●)はブタカルシトニン受容体(CTR)を導入したオポッサム腎上皮細胞の場合を示し、黒四角(■)はオポッサム腎上皮細胞(OK細胞)の場合を示す。図12中の***印はp<0.001で有意差があったことを示す。

【図13】図13は、ラットにおける本発明のペプチドのCRSP投与による血中カルシウム濃度の変化を測定した結果を示す。図13の縦軸は血中カルシウム濃度(mM)を示し、横軸は時間(分)を示す。図13中の**印はp<0.01で有意差があったことを示す。

30

【図14】図14は、ラットにおける本発明のペプチドのCRSP投与による血圧の変化を測定した結果を示す。図14の縦軸は血圧(mmHg)を示し、横軸は時間(分)を示す。

【図15】図15は、ブタカルシトニン受容体(CTR)を哺乳類発現ベクターpCDNA3.1に導入し、アカゲザル腎細胞(COS-7)に発現させた細胞に対し、CRSP又はCRSP-Gly刺激によるcAMP産生量をラジオイムノアッセイにより測定した結果を示す。縦軸はcAMPの産生量(pmol/ウェル/130分)を示し、横軸はCRSPの濃度の逆対数(-log(CRSP濃度(M)))を示す。

40

【図16】図16は、LLC-PK₁細胞を用いた本発明のペプチドのブタCRSP、ウシCRSP及びイヌCRSPのcAMP産生促進活性を検討した結果を示すものである。縦軸はcAMPの産生量(pmol/ウェル/10分)を示し、横軸はCRSPの濃度の逆対数(-log(CRSP濃度(M)))を示す。図16の(■)はブタCRSPを示し、(●)はウシCRSPを示し、(▲)はイヌCRSPをそれぞれ示す。

【図17】図17は、CRSP遺伝子の塩基配列を示す。下線部がエクソンを示す。下線部の下にCRSP遺伝子のコードするアミノ酸配列を示す。

【図18】図18は、CRSP-2遺伝子の塩基配列の前半部分(1~3840塩基)を示す。

50

【図19】図19は、CRSP-2遺伝子の塩基配列の後半部分（3841～7673塩基）を示す。下線部がエクソンを示す。下線部の下にCRSP-2遺伝子のコードするアミノ酸配列を示す。

【図20】図20は、CRSP-2のcDNA塩基配列を示す。図20において、実線で囲まれた部分が成熟ペプチドで、灰色がアミドに変換されると推定されるグリシンを示す。

【図21】図21は、CRSP-3のcDNA塩基配列を示す。図21において、実線で囲まれた部分が成熟ペプチドで、灰色がアミドに変換されると推定されるグリシンを示す。

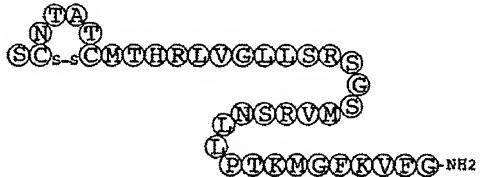
【図22】図22は、CT-2のcDNA塩基配列を示す。図22において、実線で囲まれた部分が成熟ペプチドで、灰色がアミドに変換されると推定されるグリシンを示す。図22における成熟体のN末端側にあるグルタミンはピログルタミン酸に変換されると推定される。

【図23】図23は、各CRSPとCGRPやAM、CT-2とCTのアミノ酸の比較を行った図を示す。

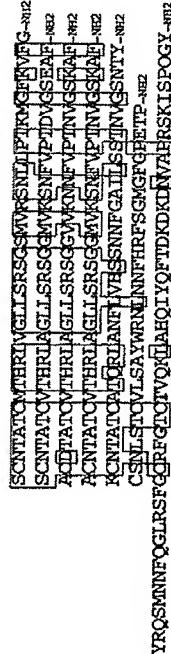
本発明のペプチドのCRSP (pCRSP)、CRSP-2 (pCRSP-2)、CRSP-3 (pCRSP-3)、CT-2 (pCT-2) のアミノ酸配列と、ブタカルシトニン遺伝子関連ペプチド (pCGRP)、ブタカルシトニン (pCT)、及びブタアドレノメデュリン (pAM) のアミノ酸配列との比較を示すものである。

【図24】図24は、CRSP、CRSP-2、CRSP-3、CT-2、CT、CGRPの遺伝子発現量をRT-PCRにより高感度定量した結果を示す。図の縦軸に各種遺伝子を、横軸に遺伝子発現量を測定したブタの組織を示す。トータルRNA量の補正のためGAPDH (グリセルアルデヒド3リン酸脱水素酵素) の発現量についても測定した。

【図1】

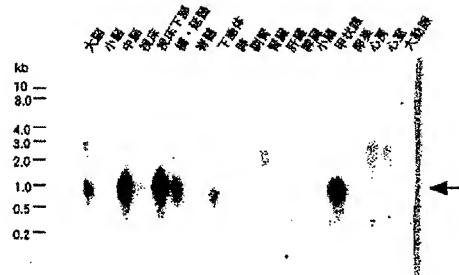


【図2】

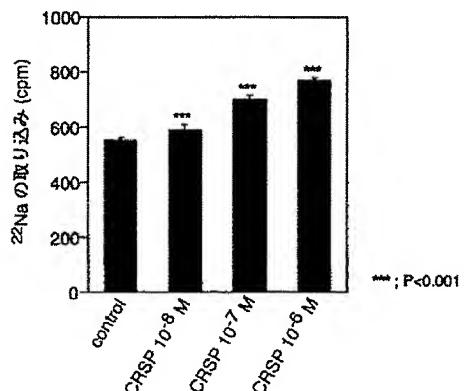


PCRS
pCGRP-I
pCGRP-II
pCT
pAM
hamylin

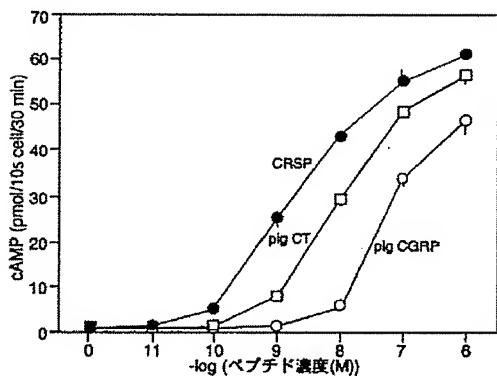
【図3】



【図5】

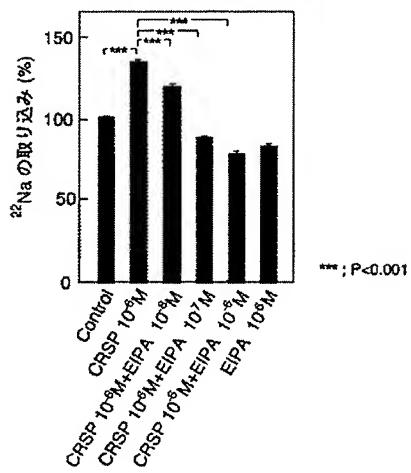
CRSP 刺激による²²Naの取り込みの変化

【図4】

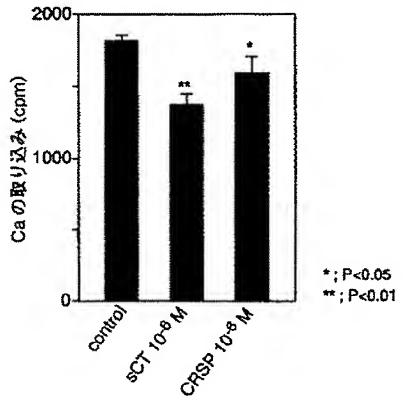


【図6】

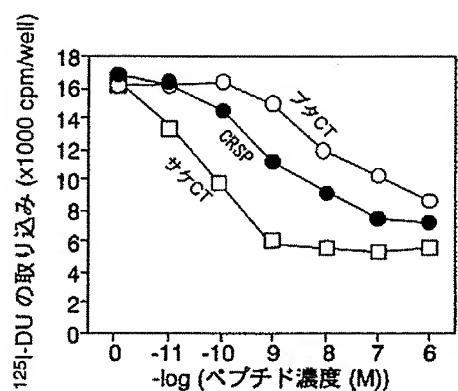
EIPA(アミロライド誘導体)によるNa取り込み上昇の阻害



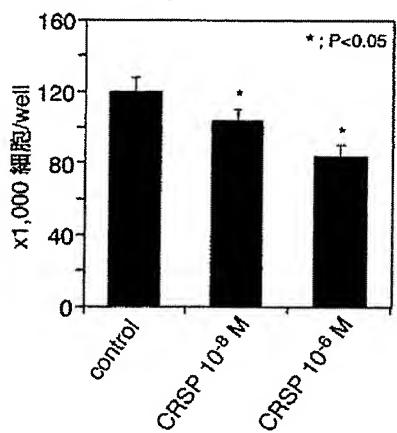
【図7】

CRSP 刺激による⁴⁵Caの取り込みの変化

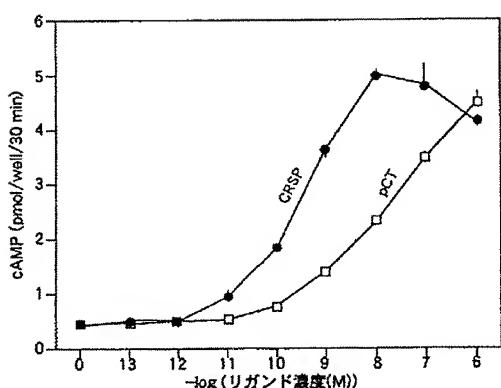
【図 8】



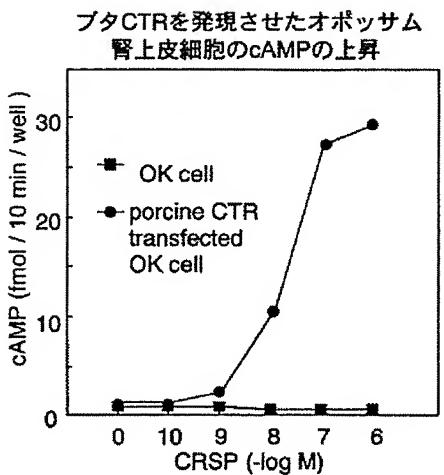
【図 9】



【図 10】

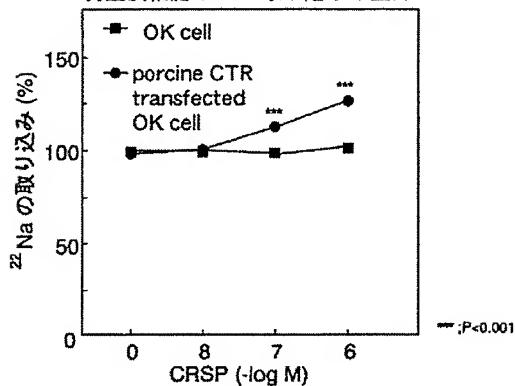


【図 11】

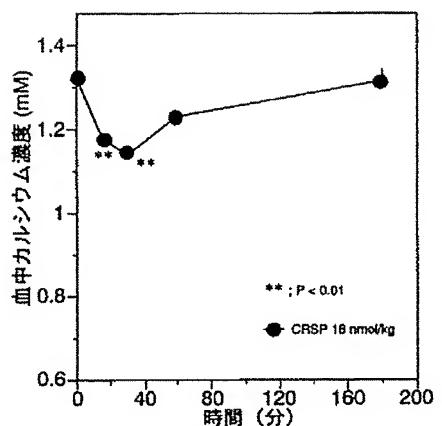


【図12】

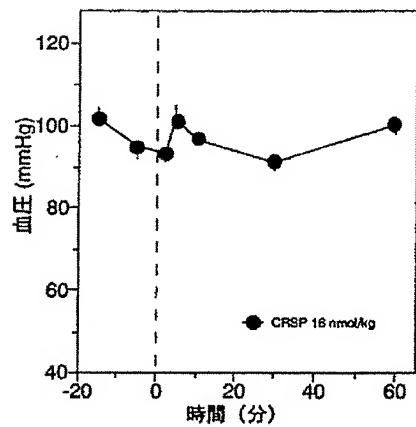
ブタCTRを発現させたオボッサム
腎上皮細胞のNaの取り込みの上昇



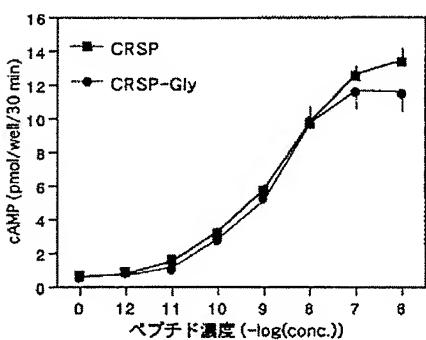
【図13】



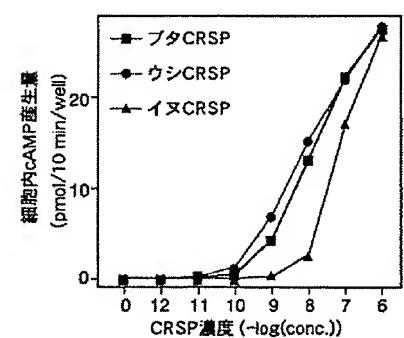
【図14】



【図15】



【図16】

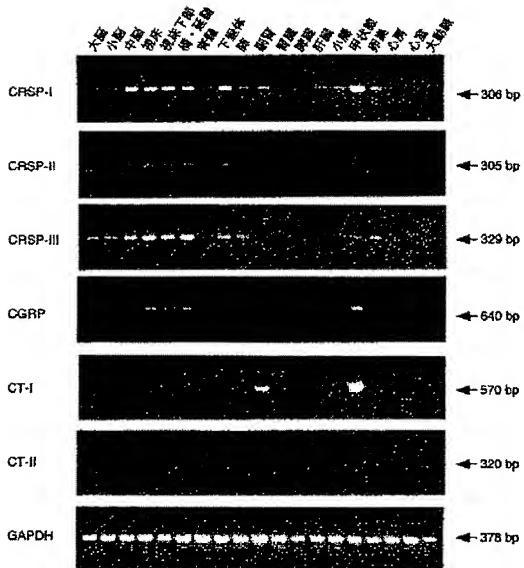


〔図21〕

【図22】

【図23】

[図24]



フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁷

F I

テーマコード (参考)

A 6 1 P 9/12	A 6 1 P 19/10
A 6 1 P 19/10	A 6 1 P 25/04
A 6 1 P 25/04	A 6 1 P 35/00
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 43/00 1 1 1
A 6 1 P 43/00	C 0 7 K 14/47
C 0 7 K 14/47	A 6 1 K 37/02

F ターム(参考) 4C084 AA02 AA07 BA01 BA08 BA19 CA21 CA28 DB31 MA28 MA44
MA52 MA60 MA63 MA66 ZA082 ZA362 ZA422 ZA702 ZA832 ZA972
ZB262
4H045 AA10 AA30 BA10 BA19 CA45 EA21 EA23 EA26 EA27 EA28
FA71 GA20